

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Ján Sabó

**Charakterizace integrálních membránových peptidů pomocí
hmotnostní spektrometrie**

Mass spectrometry analysis of integral membrane peptides

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marek Cebecauer, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod odborným vedením Mgr. Marka Cebecauera, Ph.D. a RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Ján Sabó

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Markovi Cebcauerovi, Ph.D. a svému konzultantovi RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, cenné rady a připomínky při zpracování této bakalářské práce. Chtěl bych také poděkovat členům jejich vědeckých týmů za velmi příjemné pracovní prostředí. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Marii Olšinové, Ph.D. za čas, ochotu a odborné rady při přípravě vzorků.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za poskytnuté zázemí a podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Biologické membrány zabezpečují v živých organismech velkou škálu životně důležitých procesů. Složení lipidů i proteinů v biologických membránách je velmi komplexní. Pro chápání bazálních membránových mechanismů je proto nutné využívat zjednodušené modely *in vitro*. Transmembránové proteiny I. a II. druhu je možné nahradit krátkými, α -helix tvořícími, syntetickými peptidy. Hydrofobní charakter peptidů a jejich pozice v membránách dobře reprezentuje transmembránové domény proteinů v živých organismech. Mezi jedny z nejjednodušších a nejhojněji využívaných modelových membránových systémů patří liposomy. Metody pro jejich formaci jsou známy již dlouhou dobu, ale kvantifikace jednotlivých složek liposomů po jejich zformování není úplně snadná. Je však velmi žádaná, pro zachování maximální kontroly nad daným modelovým systémem. V této práci byla adaptována metoda pro delipidizaci transmembránových peptidů, které byly následně charakterizovány pomocí LC/MS.

Relativní množství peptidu, jenž se nachází ve vezikulách po jejich formaci, bylo získáno zpracováním extrahovaných chromatogramů pro ionty peptidu. Zjistili jsme, že touto metodou je možné relativně přesně charakterizovat proteo-lipidové vezikuly s obsahem peptidů 5-10 mol%. Ztráty peptidu při inkorporaci nepřesahují 50 % a mohou být použity pro interpretaci biofyzikálních měření. Z důvodu velkých ztrát peptidu v průběhu procesu delipidizace, nebylo možné stanovit inkorporaci peptidu do vezikul s 2,5 mol%.

Klíčová slova: liposomy, syntetické transmembránové peptidy, LC/MS

Abstract

Biological membranes ensure a large scale of vital processes in the living organisms. Lipid and protein composition is very complex in the membranes. Therefore, simplified model systems were developed to study basic mechanisms regulating the function of membranes. To simulate transmembrane proteins of the type I and II, the short, α -helix-forming, synthetic peptides are employed. The hydrophobic character of the peptides and their transbilayer positioning in membranes well represents transmembrane domains of proteins in the living organisms. One of the simplest and most widely used model membrane systems are liposomes. Methods for their formation has been known for a long time. Quantification of their components after the process of liposome preparation is challenging, but for the maximal control over given model system very desirable. In this work, we adapted a formerly described protocol for delipidisation of the transmembrane peptides for their consequent characterisation by LC/MS.

A relative amount of peptide successfully incorporated into vesicles was acquired by the analysis of extracted chromatograms of peptide ions. We demonstrate that analysis of vesicles with peptide content of 5-10 mol% is feasible and the loss of the peptide is below 50 %. Such vesicles can be used for further biophysical characterisation. At the peptide content of 2.5 mol%, we were unable to semi-quantitatively determine the incorporation of the peptide due to losses in the process of its delipidisation.

Key words: liposomes, synthetic transmembrane peptides, LC/MS

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk.....	8
1 Úvod.....	9
1.1 Biologické membrány	9
1.1.1 Lipidy biologických membrán.....	10
1.1.2 Membránové proteiny	11
1.2 Modelové membránové systémy.....	13
1.2.1 Liposomy	14
1.2.2 Modelové membrány a proteiny	15
1.2.3 Využití syntetických peptidů	15
1.2.4 Pozitivní hydrofobní rozdíl.....	17
1.2.5 Negativní hydrofobní rozdíl.....	18
1.2.6 Inkorporace peptidů do liposomů	19
2 Cíl práce	20
3 Materiál.....	21
3.1 Chemikálie	21
3.2 Kolony.....	21
3.3 Přístroje	21
4 Metody.....	22
4.1 Teorie:	22
4.1.1 Formace liposomů (LUV).....	22
4.1.2 Dynamický rozptyl světla (DLS).....	22
4.1.3 Kapalinová chromatografie.....	22
4.1.4 Delipidizace	23
4.1.5 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)	23
4.1.6 Hmotnostní spektrometrie (MS)	24

4.2	Pracovní postup	24
4.2.1	Příprava LUV s LW21	24
4.2.2	Čištění extruderu	25
4.2.3	Příprava vezikul	25
4.2.4	DLS analýza	26
4.2.5	Příprava kontrol	26
4.2.6	Delipidizace	27
4.2.7	Příprava vzorků pro LC/MS analýzu	28
4.2.8	Podmínky separace HPLC	29
4.2.9	Podmínky MS měření	30
4.2.10	Analýza MS dat	30
5	Výsledky	32
5.1	Kalibrační měření peptidu LW21	32
5.2	Vezikuly s 2,5 mol% LW21	34
5.2.1	DLS	34
5.2.2	LC/MS analýza	35
5.3	Vezikuly s 5 % LW21	36
5.3.1	DLS analýza	36
5.3.2	LC/MS analýza	37
5.4	Vezikuly s 10 % LW21	42
5.4.1	LC/MS analýza	42
6	Diskuse	44
7	Závěr	47
8	Zdroje	48

Seznam použitých symbolů a zkratek

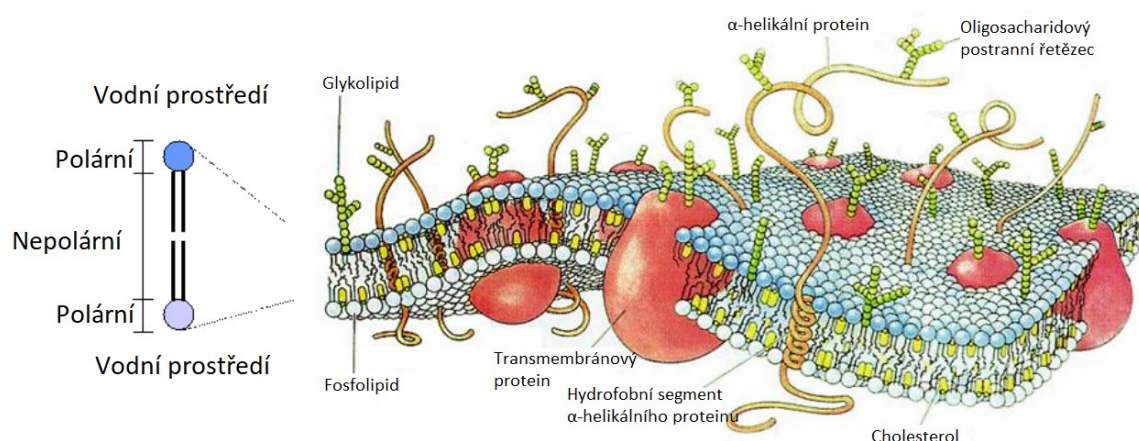
ACN	acetonitril
AK	aminokyselina
DCM	dichlormethan
DLS	dynamický rozptyl světla
DOPC	diolelylfosfatidylcholin
EIC	chromatogram vybraného iontu
ESI	ionizace pomocí elektrospreje
FA	kyselina mravenčí
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LUV	velké unilamelární vezikuly
m/z	poměr hmoty k náboji
MeOH	methanol
MiliQ	filtrovaná voda Milipore
MLV	velké multilamelární vezikuly
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PC	fosfatidylcholin
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
TIC	chromatogram všech iontů

1 Úvod

1.1 Biologické membrány

Existence života, jak jí dnes známe, je podmíněná existencí biologických membrán. Ty zabezpečují oddělení buňky od vnějšího prostředí (plazmatická membrána) a u eukaryotních organismů také vnitřní rozdělení buňky na menší části – kompartmenty (jádro a membránové organelly). Biologické membrány jsou převážně tvořeny dvojvrstvou lipidů. Ty spolu interagují hydrofobními částmi a jejich hydrofilní polární hlavičky tvoří rozhraní s vodním prostředím na obou stranách dvojvrstvy (obr. 1). Biologické membrány obsahují také velké množství různých membránových proteinů (obr. 1), které jsou zodpovědné za variabilitu jejich funkcí v živých organismech. Mezi tyto funkce patří například transport látek a jeho regulace, strukturní funkce – kotvení cytoskeletu, signalizace, či katalýza metabolických dějů. Studium biologických membrán je možné nalézt odpovědi na mnohé biochemické, biologické či medicínské otázky.

Model fluidní mozaiky, navržen Singerem a Nicolsonem v roce 1972¹, popisuje organizaci biologických membrán (obr. 1). Jak již bylo zmíněno jde o dvojvrstvu lipidů, ve které se mohou proteiny i lipidy téměř volně pohybovat dvoudimenzionální difuzí. Fluidita membrány bývá při rozdílných teplotách zachovávána změnami ve složení lipidů². Fosfolipidy s nenasycenými hydrofobními řetězci snižují bod tuhnutí membrány, čímž zabezpečují fluiditu při nižších teplotách. V membránách eukaryot, které obsahují nasycené mastné kyseliny, tuto vlastnost zabezpečuje také cholesterol.



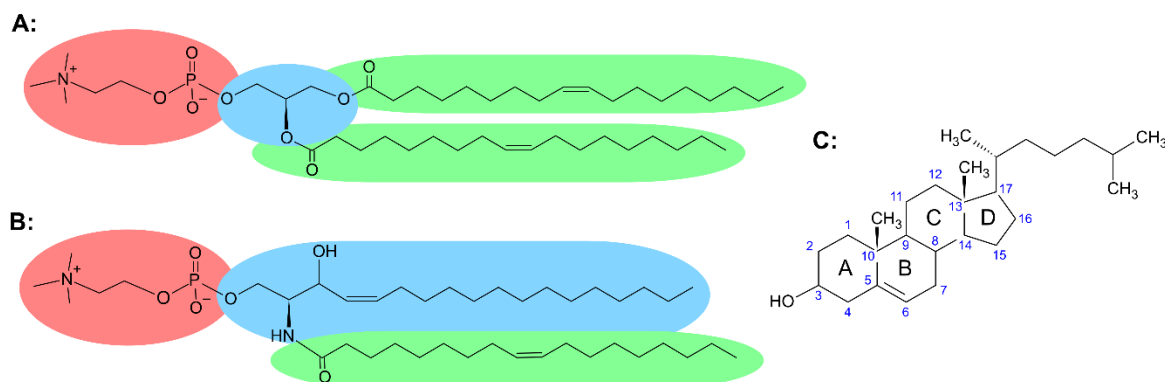
Obr. 1: Biologická membrána oddělující dvě vodná prostředí. Na levé straně obrázku je schematicky znázorněno rozdělení dvojvrstvy podle polarit. Zbýlá část představuje ilustraci biologické membrány podle modelu fluidní mozaiky, která obsahuje fosfolipidy, cholesterol, glykolipidy či různé druhy transmembránových proteinů. Všechny její složky se mohou pohybovat dvoudimenzionální difuzí. Obrázek byl převzat a upraven³.

1.1.1 Lipidy biologických membrán

Vlastnosti biologických membrán a schopnost samovolné formace dvojvrstvy je předurčena chemickou strukturou amfipatických fosfolipidů. Hlavní hnací silou spontánní formace dvojvrstvy jsou hydrofobní interakce mezi jejich nepolárními řetězci. Nejde o interakci v pravém smyslu slova. Systém se snaží dostat do stavu, ve kterém je zabezpečena nejvyšší možná termodynamická rovnováha. Při vystavení nepolárních řetězců vodnímu prostředí se na jejich povrchu musí molekuly vody uspořádat do útvarů podobných klecím. Zabezpečí se tak největší možný počet vodíkových vazeb, čímž se entropie daného systému sníží⁴. Amfipatické molekuly fosfolipidů polární hlavičkou interagují s vodou a nepolární řetězce se před vodou „schovají“ v nitru membrány, aby byla entropie fosfolipidů ve vodném prostředí maximalizovaná (obr. 1, str. 9).

Glycerolfosfolipidy jsou nejvíce zastoupené fosfolipidy v membránách. Jejich základem je 3-fosfoglycerol, ve kterém jsou na zbylé hydroxylové skupiny pomocí esterové vazby navázány různé mastné kyseliny. Fosfodiesterovou vazbou mohou být připojeny další polární či nabitě zbytky, což dává vzniku různých druhů fosfolipidů – např. fosfatidylcholin (dále jen PC), fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol (obr. 2, str. 11). V membránách rostlin jsou dominantně zastoupené galaktolipidy. Jde o diacylglyceroly, které mají glykosidickou vazbou přes 1-hydroxyl vázanou galaktózu a neobsahují tedy fosfát. Další skupinou lipidů jsou sfingolipidy, které na rozdíl od předcházejících skupin neobsahují glycerol. Jejich struktura je odvozena od mastného amino-alkoholu sfingosinu. Pokud se na jeho amino skupinu naváže mastná kyselina mluvíme o ceramidech. Dále můžeme sfingolipidy rozdělit podle polárních hlaviček, které se na molekulu ceramidu vážou. Rozlišujeme: sfingomyeliny (obsahují fosfocholin nebo fosfoethanolamin) (obr. 2, str. 11), cerebrosidy (obsahují cukernou složku navázanou glykosidickou vazbou) a gangliosidy (v cukerné složce obsahují kyselinu sialovou).

Nezbytnou součástí membrán eukaryotních organismů jsou steroly, které jsou odvozené od stearanu (cyklopentanperhydrofenantren) a působí jako modulátory rigidity membrán. Hlavním zástupcem je amfipatický cholesterol, kterého struktura je na obr. 2 (str. 11).

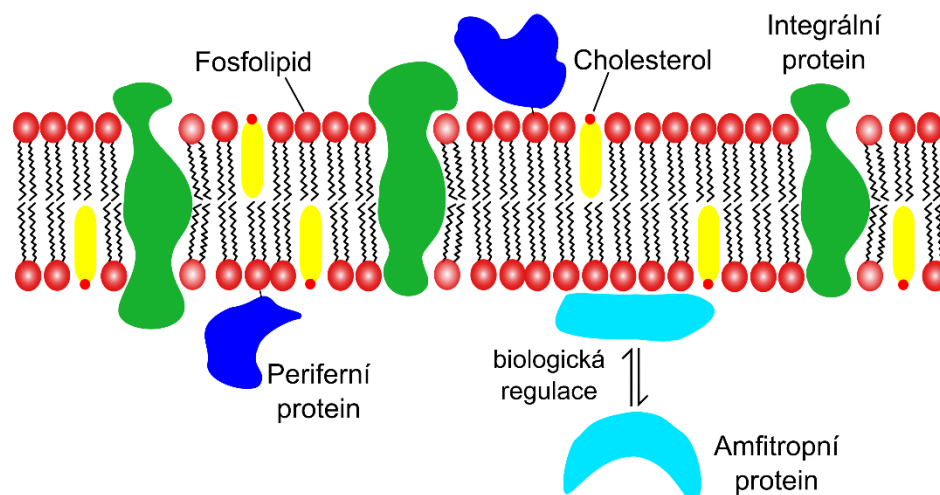


Obr. 2: Chemické struktury vybraných membránových lipidů. A: Příklad struktury glycerolfosfolipidu, konkrétně diolelylfosfatidilcholinu (dále DOPC). Zvýrazněny části: červená – fosfocholin, modrá – glycerol, zelená – kys. olejová. **B:** Příklad struktury sfingomyelinu. Zvýrazněny části: červená – fosfocholin, modrá – sfingosin a zelená – kys. olejová. **C:** Struktura cholesterolu. Sterolové jádro je složeno z kondenzovaných kruhů A-D, spolu se zbylými alkyly tvoří hydrofobní část. Amfipatický charakter je zabezpečen přítomností hydroxy skupiny na C3 uhlíku.

1.1.2 Membránové proteiny

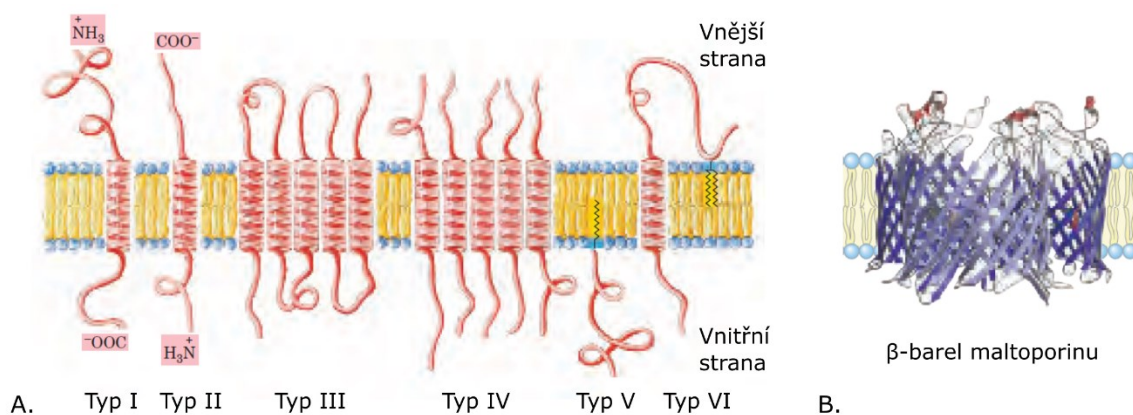
Jak již bylo zmíněno, primárně membránové proteiny určují škálu vlastností buněčných membrán. Jejich hmotnostní zastoupení v membránách některých mikroorganismů může být až 75 % (*E. coli*, *Halobacterium cutirubrum* či *halobiurn*)⁵. Mezi nejznámější membrány, které jsou téměř saturovány transmembránovými proteiny, patří vnitřní mitochondriální membrány zabezpečující buněčné dýchání a membrány tylakoidů v chloroplastech zelených rostlin, které se podílí na absorpci fotonů při fotosyntéze.

Podle typu asociace proteinů s membránou můžeme proteiny rozdělit do třech skupin: amfotropní, periferní a integrální membránové proteiny (obr. 3, str. 12). Amfotropní proteiny se mohou nacházet jak na membráně, tak v cytosolu a s membránou asociují reverzibilně pomocí nekovalentních interakcí s proteiny nebo polárními hlavičkami lipidů. Jejich afinita vůči membráně je regulována fosforylací nebo navázáním ligandů, které mohou způsobit změnu konformace, a tím na buněčné úrovni regulovat různé děje, např. fagocytózu⁶. Periferní membránové proteiny mohou být do membrány zachyceny několika způsoby: kovalentní vazbou na lipid, tzv. GPI-kotva (z angl. „GPI anchor“), posttranslační modifikací, např. acylací (palmitoylace, N-myristoylace) nebo navázáním isoprenoidů (farnesyl, geranylgeranyl)⁴. Za fyziologických podmínek nejsou přítomny v cytosolu, ale jsou stabilní součástí biologických membrán. Mezi periferní membránové proteiny patří například tyrosinkinasa specifická pro lymfocyty (Lck z angl. „lymphocyte-specific protein tyrosine kinase“)⁷.



Obr. 3: Rozdělení membránových proteinů podle rozsahu interakcí s membránou. Amfitropní (světle modrá) interagují reverzibilně, periferní (modrá) jsou zachyceny pomocí lipidové kotvy a integrální (zelená) přecházejí přes celou tloušťku membrány.

Integrální membránové proteiny jsou do membrány inkorporovány velmi stabilně, protože přecházejí přes celou její tloušťku. Transmembránové domény proteinů obsahují převážně nepolární aminokyseliny (dále AK), které interagují s uhlíkovými řetězci lipidů. Ze známé sekvence AK je možné určit počet transmembránových domén proteinu vynesemím tzv. indexu hydropatie (z angl. „hydrophaty index“)⁸, neboť je známo, že dochází k jejich selektivní interakci s nepolárními řetězci lipidů v biologických membránách. Ze známých vazebných délek a úhlů v α -helixu je možné získat informaci o počtu AK potřebných k přechodu domény proteinu přes celou tloušťku membrány. Vyhledáním kolem 20 opakujících se nepolárních AK v řadě je následně jednoduché určit transmembránové α -helikální domény proteinů. Do membrány tedy mohou být proteiny zachyceny jednou (např. glykoporin) nebo několika (např. bakteriorhodopsin) transmembránovými doménami, které jsou tvořeny α -helixy. Všechny tyto domény či modifikace můžeme rozdělit na 6 typů (obr. 4, str. 13). Poslední možností zachycení v membráně je tvorba β -barelu, který je celý tvořen β -skládaným listem a je možné si jej představit jako kužel s vnitřním otvorem, který přechází skrz membránu (obr. 4, str. 13). Tenhle typ transmembránové domény se nejčastěji nachází v bakteriálních membránách, kde tvoří různé druhy porinů (např. maltoporin viz. obr. 4, str. 13)⁴.



Obr. 4: Typy kotvení transmembránových proteinů. **A:** Šest strukturních typů, do kterých můžeme zařadit α -helikální a přes nepolární složku zachycené transmembránové proteiny. **B:** Další možností inkorporace je vytvoření β -barelu. Tento typ kotvení byl mnohokrát sledován u bakterií při tvorbě porinů. Obrázek byl převzat a upraven⁴.

V membránových doménách krystalografických struktur mnohých membránových proteinů (např. bakteriorhodopsin nebo cytochrom *c* oxidázy)^{9,10} je možné sledovat přítomnost endogenních lipidů. Za předpokladu, že krystalická struktura proteinů odpovídá té nativní, musí v membráně docházet ke stabilní interakci lipid-protein. Pro systematickou studii těchto interakcí je biologické prostředí nesmírně složité. Z důvodu obrovské variability proteinů i lipidů v živých organismech se přistupuje k využití zjednodušených modelových systémů. V nich je pak díky nižší komplexitě možné interakce lipid-protein lépe sledovat a postupně tak odhalovat jejich vztahy v membránách živých buněk.

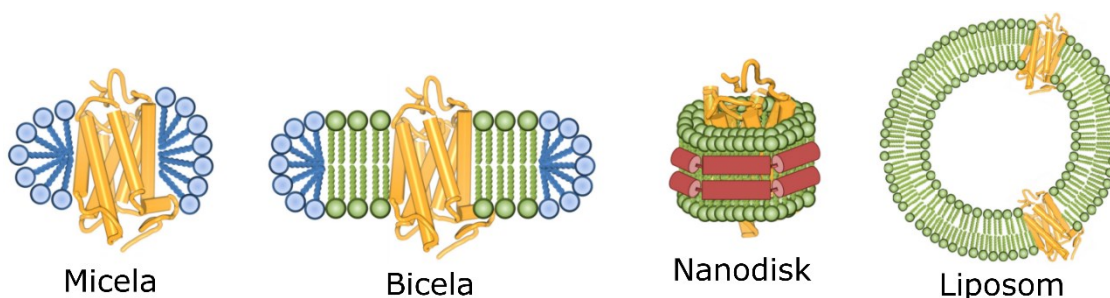
1.2 Modelové membránové systémy

Jak již bylo zmíněno, variabilita lipidů a transmembránových segmentů proteinů je v živých organismech obrovská a systematická studie interakcí lipid-protein, lipid-lipid nebo protein-protein za těchto podmínek prakticky neuskutečnitelná. Řešením je práce s mnohokrát zjednodušenými systémy, které jsou ale stále biochemicky i biologicky relevantní. Existuje celá řada modelových membránových systémů, které jsou přizpůsobeny tak, aby vyhovovaly požadavkům na relevantnost k živým systémům, byly jednoduché na přípravu a současně je bylo možné analyzovat pomocí některé z instrumentálních metod užívaných v přírodních vědách.

Modelový systém, který se využívá na studium plasmatické membrány a nejvíc se blíží k membránám živých buněk, jsou vezikuly odvozené od živých buněk, známé též jako sféry z plasmatické membrány (PMS z angl. „plasma membrane spheres“) nebo obrovské vezikuly plasmatické membrány (GPMV z angl. „giant plasma membrane vesicles“). Jde o volnou membránu, kterou je možné získat vydouváním ze živých buněk v prostředí

formaldehydu, obdobných krátkých aldehydů a redukčních činidel blokujících tvorbu disulfidů. Složením lipidů a proteinů tento modelový systém částečně odpovídá plasmatické membráně živých buněk. Nicméně postrádá kotvení cytoskeletu, asymetrii a membránový potenciál¹¹.

Mezi další, velmi jednoduché, modelové systémy patří micely, bicely a nanodisky. Micely jsou tvořeny jen jednou vrstvou lipidů, polární hlavičky tedy interagují s vodním prostředím a hydrofobní řetězce tvoří nepolární nitro dané struktury (obr. 5). Ve směsích lipidů s detergenty se micely často používají ke strukturním analýzám membránových proteinů pomocí rentgenové krystalografie či nukleární magnetické rezonance (dále jen NMR)¹². Bicely se víc podobají membráně, protože díky použití specifických detergentů již vytvářejí dvojvrstvu (obr. 5). Detergenty jsou schopné stabilizovat okraje bicel a tím je udržet ve stavu, který je pro samotné lipidy nestabilní¹³. Bicely je také možné využít ke strukturní analýze transmembránových proteinů¹⁴. Využití nanodisků je obdobné jako u micel a bicel, liší se však strukturou. Tvar a velikost nanodisku je určována amfipatickým proteinovým nebo polymerním lešením. To mezi svými podjednotkami vytváří prostor, který je vyplněn dvojvrstvou lipidů a na rozdíl od předchozích struktur neobsahující detergenty (obr. 5)¹⁵. Do dvojvrstvy nanodisku může být zabudován transmembránový protein, kterého struktura nebo funkce je analyzována¹⁶.



Obr. 5: Struktury vybraných modelových membrán. Zleva: **Micely** jsou tvořeny jednou vrstvou lipidů nebo detergentů. **Bicely** obsahují směs fosfolipidů (tvoří dvojvrstvu) a detergentů (umožňují zakřivení na okrajích dvojvrstvy). **Nanodisky** jsou tvořeny proteinovým nebo polymerním lešením, kterého nitro je vyplněno fosfolipidy. **Liposomy** jsou tvořeny dvojvrstvou fosfolipidů, do které mohou být inkorporovány proteiny. Obrázek byl převzat a upraven¹⁷.

1.2.1 Liposomy

Liposomy jsou jednoduché lipidové váčky tvořené dvojvrstvou fosfolipidů (obr. 5), které se již dlouhou dobu používají na různé aplikace jako je třeba distribuce léčiv¹⁸, transformace buněk při klonování¹⁹ či jako modelové membránové systémy pro různé biochemické nebo biofyzikální studie^{20,21}. Můžeme je rozdělit podle počtu dvojvrstev (unilamelární a multilamelární) anebo průměru (malé, velké, obrovské). Mezi liposomy s více

membránami řadíme tzv. velké multilamelární vezikuly (dále jen MLV z angl. „large multilamellar vesicles“). MLV jsou větší než 400 nm, získávají se hydratací lipidových filmů a jejich hlavní využití je pro studie organizace a pohybu individuálních molekul lipidů v membránových strukturách²². Malé unilamelární vezikuly (SUV z angl. „small unilamellar vesicles“) můžeme získat např. sonikací MLV. Velikost tímto způsobem připravených vezikul byla stanovena na 25–50 nm a poměr počtu lipidů v jednotlivých vrstvách membrány může být až 1:2 (vnitřní ku vnější). Z MLV můžeme pomocí extruze přes póry polykarbonátové membrány o známém průměru (100-400 nm), získat také velké unilamelární vezikuly (dále jen LUV z angl. „large unilamellar vesicles“). Ty mají díky většímu poloměru než SUV menší poruchy v zakřivení²². Největší průměr (nad 5 μm) mají obrovské unilamelární vezikuly (GUV z angl. „giant unilamellar vesicles“)²². Ty mohou být formovány mnoha způsoby např. přirozeným „bobtnáním“ (z angl. „natural swelling“)²³ nebo elektroformací z lipidových filmů²⁴. Všechny výše zmíněné vezikuly mohou být připraveny z lipidových filmů, což umožňuje jednoduchou volbu jejich lipidového složení. Proto jsou liposomy vhodné pro systematické studie *in vitro* interakcí lipidů a proteinů v membránách živých organismů.

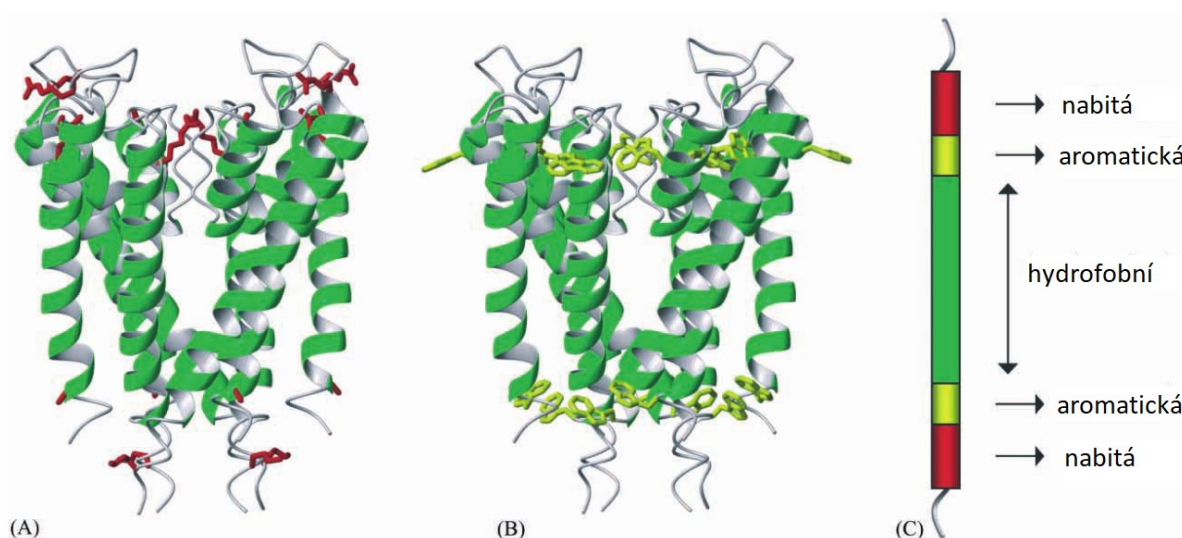
1.2.2 Modelové membrány a proteiny

Při práci s proteiny je častokrát nutné izolovat je ze živého zdroje a následně purifikovat komplexními postupy. Pro zachování správné funkce izolovaných proteinů je nutné jemné zacházení, které zaručí jejich nativní konformaci po dokončení purifikace. Celý proces izolace proteinu se stává ještě složitější, když se purifikují membránové proteiny. Při studii transmembránových proteinů v modelových membránách je po zdlouhavém a náročném procesu izolace nutné protein do dané modelové membrány inkorporovat. Proces inkorporace je opět komplikovaný a častokrát málo účinný²¹. Dalším z problémů při inkorporaci může být ztráta funkce daného proteinu²⁵. Při studiích mobility proteinů v membránách je potřeba daný protein ještě fluorescenčně označit, což také snižuje celkovou efektivitu procesu²¹.

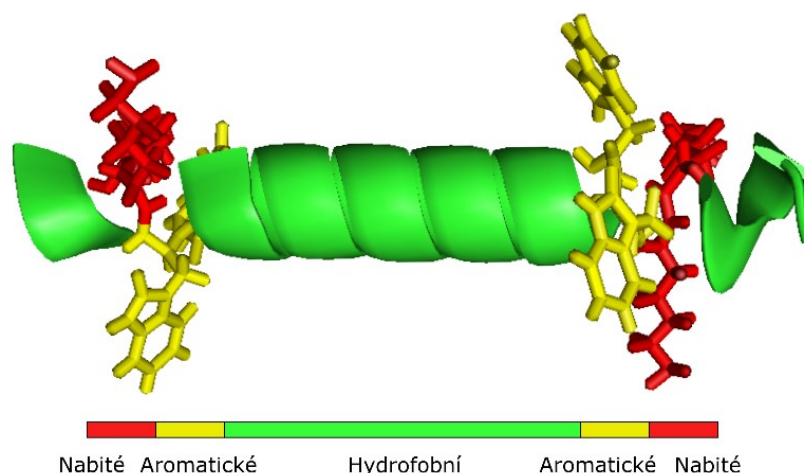
1.2.3 Využití syntetických peptidů

Mnohé proteiny přecházejí přes membránu pomocí jednoho či více α -helixů (obr. 4, str. 13). Pro studium interakce protein-lipid, je tedy možné zvolit zjednodušený systém, ve kterém je transmembránová doména proteinu nahrazena syntetickým peptidem. Ten se ale musí snadno inkorporovat a vytvářet v hydrofobním prostředí membrány stabilní helikální strukturu. Při návrhu syntetických peptidů bylo proto využito známé rozložení polárních,

nepolárních a aromatických AK v transmembránových doménách z již vyřešených struktur proteinů (obr. 6)²⁶. Krystalografické studie odhalili, že nabitě postranní řetězce se nacházejí na rozhraní voda-dvojvrstva, směrem dovnitř membrány pak následují aromatické AK a přes membránu přechází hydrofobní část (obr. 6). Následně byla zkoumána schopnost inkorporace a tvorba stabilního α -helixu v závislosti na složení AK daného syntetického peptidu (přehled prací²⁷). Na další studie v modelových membránách jsou v současné době využívány rodiny peptidů KALP či WALP, které na svých okrajích obsahují Lys nebo Trp. Jejich hydrofobní část může být tvořena polyLeu nebo poly(Leu-Ala) a splňují předpoklady na snadnou inkorporaci i tvorbu stabilního α -helixu. Peptid, který byl použit v mé bakalářské práci obsahuje dva Lys a dva Trp na obou svých koncích a jeho hydrofobní část je tvořena Leu₈-Ala-Leu₈. Jeho celková sekvence AK je GLLDSKKWWL LLLLL LLALL LLLL LWKK FSRS-amid, kde pět AK z N- a čtyři AK z C- konce jsou identické s okrajovými motivy membránové domény na lidském TCR ζ . Zmíněný peptid bude dále označován jako LW21 (obr. 7, str. 17).



Obr. 6: Struktura transmembránové domény draselného iontového kanálu ze *Streptomyces lividans*²⁶. α -helixy jsou ohraničené pásem zbytků Arg (červeně část A) a Trp (žlutě část B). Rozdělení AK můžeme zobecnit (C) a použít při syntéze modelových peptidů (obr. 7, str. 17). Obrázek byl převzat a upraven²⁷.



Obr. 7: Struktura syntetického peptidu LW21. V roztoku i v membráně má stabilní α -helikální strukturu a dodržuje rozložení nabitých, aromatických a hydrofobních AK, které bylo odvozeno z krystalografických struktur proteinů. Pět AK z N- a čtyři AK z C- konce jsou identické s okrajovými motivy membránové domény na lidském TCR ζ .

Rozdíl v délce hydrofobní transmembránové domény proteinu a tloušťky hydrofobní části dvojvrstvy může být pozitivní, délka domény proteinu je větší než tloušťka membrány nebo negativní, pokud je tomu naopak. Jako model transmembránové domény proteinu je využíván jednoduchý hydrofobní α -helix, který může být lehce syntetizován a jeho hydrofobní délka přizpůsobena (např. LW21 viz. obr. 7). Při hydrofobním rozdílu se systém α -helix-membrána nachází v energeticky nevýhodném stavu a do úvahy přichází řada relaxací. Při pozitivním rozdílu může docházet k agregaci, změně konformace uhlíkové kostry, naklonění helixu od normály dvojvrstvy nebo změna orientace postranních řetězců AK nacházejících se na rozhraní lipid/voda. Při negativním rozdílu přichází v úvahu všechny relaxace jako u pozitivního rozdílu kromě náklonu od normály. Lipidy by při pozitivním rozdílu mohly umožnit relaxaci systému natažením svých mastných kyselin v okolí peptidu a při negativním rozdílu zvýšením neuspořádanosti v této oblasti²⁸.

1.2.4 Pozitivní hydrofobní rozdíl

Využitím modelových membrán byly zkoumány možné relaxace systémů s pozitivním hydrofobním rozdílem. Jednou z možných relaxací je agregace, při které zvětšující se rozdíl zvyšuje interakce peptidů v membráně, čím se snižuje celková, vodnímu prostředí vystavená, hydrofobní oblast peptidu. Se zvyšujícím se poměrem koncentrací (peptid/lipidy) dochází ke tvorbě až makroskopických agregátů peptidů²⁹. Změnou konformace uhlíkové kostry peptidu z α -helixu na π -helix by také mohlo docházet k relaxaci energeticky nevýhodného stavu. Využitím WALP peptidů bylo ale zjištěno, že k této formě relaxace nedochází ani za výrazného hydrofobního rozdílu³⁰. Další formou relaxace, při které se

zmenší efektivní délka hydrofobní části peptidu, může být jeho náklon od normály dvojvrstvy. Naklánění bylo skutečně sledováno u peptidů KALP, ale bez ostatních forem relaxace není dostatečné pro kompenzaci hydrofobního rozdílu³¹. U WALP peptidů naklánění sledováno nebylo³⁰, což poukazuje na závislost náklonu na postranních řetězcích v oblasti rozhraní voda/lipid. Peptid by se mohl přizpůsobit tloušťce membrány také změnou orientace postranních řetězců na rozhraní voda/lipid. Pomocí WALP a jim podobným peptidům bylo zjištěno, že Trp se specificky nachází na rozhraní a ani při výrazném hydrofobním rozdílu nemění svou polohu³². U peptidů s Lys jako okrajovou AK tato specifita nebyla sledována³³. Matracový model biologických membrán říká, že relaxaci hydrofobního rozdílu by mohly zabezpečit také lipidy³⁴. U pozitivního rozdílu by mohlo docházet k natahování alifatického uhlíkového řetězce fosfolipidů. Tato relaxace byla sledována jenom v malém rozsahu a znamená velkou energetickou náročnost³⁵.

1.2.5 Negativní hydrofobní rozdíl

Jde o jev opačný k pozitivnímu rozdílu, kdy je délka hydrofobní části transmembránového proteinu (ve zjednodušených modelech α -helix tvořícího peptidu) kratší než tloušťka membrány. Opět platí, že je tento systém v nerovnováze, protože interakce hydrofobních řetězců s nabitými okrajovými skupinami peptidu je energeticky nevýhodná. Obdobně jako při pozitivním rozdílu je jednou z možných relaxací tohoto stavu oligomerizace, která byla u KALP peptidů dokázána pomocí fluorescenčních měření v MLV³⁶. Také při negativním rozdílu je teoreticky možná změna α -helixu na 3_{10} helix, která ale ani při výrazném rozdílu nebyla experimentálně prokázána³⁰. Prodloužení hydrofobní oblasti transmembránového peptidu je možné také změnou orientace postranních řetězců AK v oblasti rozhraní voda/lipid. Efektivní délka peptidů WALP se ale při změně lipidů v jeho okolí nemění³⁷. U peptidů KALP byla sledována závislost efektivní délky na lipidickém okolí. V lipidech, které se samovolně formují do dvojvrstvy (např. PC), byla delší než v těch, které dvojvrstvy netvoří³⁷. Postranní řetězce Lys tedy mohou v membránách „šnorchlovat“ (z angl. „snorkeling“), což znamená, že kladně nabitá aminoskupina se nachází v polární oblasti, a C α je ponořené do hydrofobní části dvojvrstvy. Systematické snižování uspořádanosti lipidů v okolí peptidu s rostoucím negativním rozdílem bylo při využití NMR sledováno jenom v malém rozsahu³⁵. To by samo o sobě nepostačovalo pro relaxaci tohoto systému a znamená to, že změna konformace alifatických uhlovodíků lipidů v membránách je energeticky příliš náročná.

1.2.6 Inkorporace peptidů do liposomů

Při práci s liposomy je možné kontrolovat jejich formaci různými metodami např. pomocí optické²⁰ nebo elektronové mikroskopie³⁸, případně využitím dynamického rozptylu světla (dále DLS z angl. „dynamic light scattering“)³⁹. Kvantitativní stanovení složek těchto modelových systémů zmíněnými metodami však není možné. Pro plnou definici a absolutní pochopení daného modelového systému je nezbytné znát také zastoupení všech složek po formaci liposomů. Při inkorporaci proteinů s enzymatickou aktivitou je pro kvantifikaci možné využít právě jejich aktivitu⁴⁰. Pomocí izopyknické centrifugace s následným stanovením proteinů v jednotlivých frakcích je možné stanovit jejich zastoupení i bez enzymové aktivity³⁸. Kvantifikace proteinů v jednotlivých frakcích by mohla být také provedena pomocí imunochemických metod jako třeba ELISA (z angl. „Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay“)⁴¹ či RIA (z angl. „radioimmunoassay“)⁴². Inkorporace peptidů do liposomů byla také sledována pomocí tenkovrstvé chromatografie následované barvením Coomassie Brilliant Blue²⁰. Intenzita amidového pásu I peptidů v infračervené oblasti byla také využita pro stanovení inkorporace peptidu do systému s odlišným hydrofobním rozdílem³⁰. Další skupinou technik jsou různé fluorescenční metody. Jsou velmi citlivé a jejich použití pro kvantifikaci je jednoduché z důvodu fluorescenčních vlastností Trp, který se nachází jak v proteinech tak mnohých syntetických peptidech na rozhraní voda/dvojvrstva³². Při přípravě LUV s inkorporovaným peptidem se používá extruze přes polykarbonátovou membránu. Při uvedeném postupu je dostupná jenom informace o výchozím množství používaného peptidu a následná kvantifikace pomocí fluorescence Trp se porovnává mezi vezikulami o různém složení²⁰. Reálné množství peptidu, který se inkorporuje do jednoho druhu vezikul, je po extruzi nejasné. Studie transmembránových segmentů pomocí hmotnostní spektrometrie (dále MS) využívají specifickou přípravu vzorků tak, aby se zbavili lipidů v procesu delipidizace⁴³. Přípravou kontrol, které mají stejné složení lipidů a peptidů jako vezikuly, ale neprojdou procesem hydratace a extruze, je možné zjistit množství peptidu, který se během formace liposomů ztrácí.

2 Cíl práce

Práce je zaměřená na využití LC/MS pro analýzu inkorporace peptidu LW21 do liposomů, které obsahují DOPC a cholesterol. Úlohou je zjistit množství LW21, které se při formaci vezikul metodou extruze ztrácí. Pro splnění daného úkolu je nutné řešit následující dílčí úkoly:

- naučit se samostatně připravovat liposomy technikou extruze přes polykarbonátovou membránu,
- pomocí dynamického rozptylu světla ověřit kvalitu formace vezikul,
- využitím postupu pro delipidizaci peptidů získat čistý LW21 z liposomů a kontrol pro následnou semikvantitativní analýzu pomocí LC/MS,
- analýzou získaných LC/MS dat zjistit rozsah inkorporace LW21 do vezikul o různém lipidickém složení.

3 Materiál

3.1 Chemikálie

- 2,2,2-trifluoroethanol – Alfa Aesar, USA
- acetonitril – Merck, Německo
- Agilent ESI tuning mix – Agilent Technologies, USA
- dichlormethan – Merck, Německo
- dioleoylfosfatidylcholin – Avanti Polar Lipids, USA
- glukóza – Sigma Aldrich, USA
- HEPES – Sigma Aldrich, USA
- chloroform – VWR Chemicals, USA
- cholesterol – Avanti Polar Lipids, USA
- kyselina mravenčí – Fluka Analytical, Švýcarsko
- methanol – Sigma Aldrich, USA a Merck, Německo
- NaCl – Sigma Aldrich, USA
- syntetický peptid LW21 – Videa, Česko
- voda MiliQ – filtrována Milipore – Merck Milipore, Německo
- voda pro HPLC, Lichrosolv, LC-MS grade – Merck, Německo

3.2 Kolony

- OPTI-TRAP Micro, Peptide, 5 µl, 1 mm – Optimize Technologies, USA
- Zorbax SB-C18, 0,3x150 mm 3,5 micron – Agilent Technologies, USA

3.3 Přístroje

- 15T-solarix XR FT-ICR Mass Spectrometer – Bruker Daltonics, USA
- Agilent 1 200 HPLC systém – Agilent Technologies, USA
- Eppendorf Concentrator Plus – Eppendorf, Německo
- Zetasizer Nano S – Malvern Instruments, UK

4 Metody

4.1 Teorie:

4.1.1 Formace liposomů (LUV)

Pro tvorbu liposomů, či lipidových vezikul, je třeba nejprve vytvořit lipidový film, který se zpravidla vytvoří po odpaření organických rozpouštědel pod dusíkem. Lipidy jsou z důvodu jejich značné hydrofobicity drženy v roztocích organických rozpouštědel jako methanol či chloroform, které je nutné pro přípravu lipidového filmu odpařit. Liposomy je pak možné připravit hydratací takto vytvořených lipidových filmů. K hydrataci můžeme použít libovolný pufr, který způsobí „nabobtnání“ usušených vrstev lipidů a vytvoří tak fluidní dvojvrstvy. Během „nabobtnání“ jsou hydratované lipidové filmy agitovány, např. na vortexu, čímž dochází k tvorbě MLV, které si můžeme představit jako cibuli, kde jednotlivé slupky cibule budou představovat právě lipidovou dvojvrstvu. Jejich formace může být sledována jako zakalení roztoku při hydrataci, což je způsobeno rozptylem světla na kulově symetrických částicích o různé velikosti. Z MLV je následně nutné vytvořit unilamelární vezikuly o námi stanovené velikosti. Pro tuto formaci je ale nutné dodat systému energii nejsnadněji v její mechanické formě, třeba extruzí přes membránu se stanovenou velikostí pórů či sonikací.

4.1.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Tato metoda je známa také jako quasi-elastický rozptyl světla nebo fotonová korelační spektroskopie a může být využita pro určení distribuce velikosti částic v roztoku. Pro získání této informace se využívá rozptylu laserového paprsku z objemu o definované velikosti. Po ozáření vzorku laserem se světelné vlny odráží do všech stran. Interference rozptýlených světelných vln z částic pohybujících se Brownovým pohybem způsobuje časově proměnnou intenzitu světla, která je zaznamenána pomocí detektoru umístěného pod známým úhlem mimo os laserového paprsku. Z fluktuace signálu je následně možné spočítat autokorelační funkci a z ní získat informaci o difúzním koeficientu, který je podle rovnice Einsteina-Stokesa nepřímo úměrný průměru částic³⁹.

4.1.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je preparativní a analytická metoda, jejíž princip je založen na specifické interakci rozpuštěných látek s mobilní či stacionární fází v chromatografické koloně. Každá složka (chemická látka) analyzovaného vzorku interaguje (zpomaluje se) se stacionární fází s různě velkou afinitou. Současně mají tyto látky různou rozpustnost

v mobilní fázi. Tyto jevy způsobují specifické zpomalování jednotlivých složek vzorku v koloně a tím jejich rozdělení na základě chemických vlastností. Jednotlivé složky vzorku jsou pak eluovány z kolony v rozdílném čase, který je zaznamenán. Výsledkem této analýzy je chromatogram, v kterém je vynesena závislost intenzity (v našem případě signál daného iontu) na čase. Intenzita je odezva detektoru (pro naše experimenty hmotnostní spektrometr), který zaznamenává eluci složek separovaného vzorku. Pro preparativní účely byly chromatografické principy využity k delipidizaci LUV.

4.1.4 Delipidizace

Lipidové vezikuly, jak již plyne z názvu, obsahují v porovnání s peptidy velký nadbytek lipidů. Při HPLC analýze by mohl velký nadbytek lipidů snížit kapacitu chromatografické kolony, ovlivnit eluci peptidů anebo saturovat analyzátor, což by mohlo vést k problému s analýzou dat. Delipidizací je možné specificky se zbavit velké části lipidů z připravených vezikul. Při procesu delipidizace je využita dobrá rozpustnost lipidů a transmembránových peptidů (obsahují hydrofobní AK) v organických rozpouštědlech. Tato vlastnost se využije při jejich selektivním zachycení na chromatografické koloně. Protože náš vzorek obsahuje lipidové vezikuly (LUV) v glukózovém pufru, po nanesení ředěného vzorku liposomů na obrácenou fázi kolonky, je možné zbavit se pufru (odsolení) a následně díky rozdílné hydrofobitě lipidů a peptidů eluovat nejprve lipidy pomocí silně hydrofobního rozpouštědla, např. dichlormethanu (dále DCM), a pak peptidy pomocí méně hydrofobního s vodou dobře mísitelného acetonitrilu (dále ACN). Při eluci pomocí DCM budou peptidy, i když hydrofobní, preferovat interakci se stacionární fází kolonky před elucí mobilní fází. Tenhle způsob delipidizace byl využit pro identifikaci transmembránových segmentů proteinů pomocí MS⁴³.

4.1.5 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

Jak je zřejmé z názvu, je HPLC na rozdíl od klasické chromatografie prováděna za vysokých tlaků (400 bar). Použitím vyššího tlaku mobilní fáze se celý proces separace značně urychlí, zmenší se množství vzorku potřebného pro separaci a zlepší se rozlišení. Při HPLC je mobilní fáze pomocí pumpy tlačena systémem kapilár na kolonu. Autosamplér zabezpečuje správné dávkování vzorků pro analýzu. Vzorek se zavádí do nástřikové smyčky, která je umístěná na dávkovacím ventilu. Zavedením dalšího přepínacího ventilu je možné vzorky nanést na záchytnou kolonu (z angl. „trap column“), na které je možné provést odsolení či koncentrování pro nás zajímavých analytů přímo v přístroji. Ze záchytné kolony jsou následně analyty vyplaveny mobilní fází ve směru opačném k nanášení a vedeny na

analytickou kolonu, na které jsou separovány v gradientu voda-ACN. Za ní následuje analyzátor (v našem případě MS), případně sběrač frakcí pro preparativní účely.

4.1.6 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Je analytická metoda, která dokáže detekovat molekuly obsažené v analyzovaném vzorku na základě poměru hmoty k náboji (dále m/z). Aby byla MS analýza úspěšná musí být nejprve vytvořeny ionty, které na rozdíl od neutrálních částic mohou interagovat s elektromagnetickým polem a být proto rozděleny podle m/z . Pro ionizaci vzorku slouží iontový zdroj. Existuje velké množství způsobů, jak vzorky ionizovat. Jenom některé jsou však vhodné pro ionizaci biomolekul.

Pro náš výzkum byla použita technika ionizace elektrosprejem zvaná ESI (z angl. „electro spray ionisation“)⁴⁴. Při ionizaci ESI kapalný vzorek prochází kovovou kapilárou, na kterou je přivedeno vysoké napětí. To způsobí tvorbu malých kapiček kapaliny se stejným nábojem, které se tedy odpuzují a vytvářejí tak sprej. Malé kapičky aerosolu jsou následně nasáty vakuem do další části iontového zdroje, která je vyhřívána, čímž se postupně odpařováním kapiček redukuje jejich velikost. Po odpaření veškerého rozpouštědla zůstane v plynné fázi analyt s nábojem. Ionty jsou následně převedeny do hmotnostního analyzátoru. Ten dokáže ionty rozdělit na základě jejich m/z . Existuje řada hmotnostních analyzátorů. My jsme využívali FT-ICR (z angl. „Fourier transform - ion cyclotron resonance“), který jak z názvu vyplývá využívá cyklotronovou rezonanci iontů s následnou Fourierovou transformací. Tento typ analyzátoru zachytí ionty v silném magnetickém poli, kde začnou rotovat se specifickou frekvencí pro jednotlivé m/z . Frekvence rotačního pohybu je zaznamenána a následně je pomocí Fourierovy transformace získána hodnota m/z všech iontů v analyzátoru⁴⁵.

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Příprava LUV s LW21

Postupným rozmrazováním peptidu před přípravou vezikul bylo zabráněno tepelnému šoku a jeho poškození. Z mrazícího boxu s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl přenesen do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ponechán temperovat 20 minut. Následně byl spolu s roztokem DOPC v chloroformu přenesen do lednice pro temperaci při $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, po dobu 20 minut. Posledním krokem temperace bylo jeho ponechání při pokojové teplotě asi 20 minut. Pak byl připraven zásobní roztok peptidu LW21 o koncentraci $0,2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ v trifluoroethanolu (dále jen TFE). Do označené zkušavky bylo následně pipetováno takové množství zásobního roztoku peptidu, aby jeho molární zlomek

ve směsi byl roven 0,1; 0,05 a 0,025. Dále bylo do zkumavky pipetováno množství DOPC a cholesterolu tak, aby jejich molární zastoupení odpovídalo složení, které je uvedeno v tab. 1. Směs peptidu a lipidů pak byla promíchána na vortexu s následným odpařením organických rozpouštědel pod proudem dusíku, čímž byl na dně zkumavky vytvořen pouhým okem viditelný lipidový film. Ten byl následně dosušen ve vakuovaném exsikátoru po dobu 30 minut. Přehledné složení všech připravovaných vezikul je zobrazeno v tab. 1.

Tab. 1: Složení lipidových filmů pro tvorbu vezikul. Jde o molární procenta.

Vzorek	LW21 (mol%)	DOPC (mol%)	cholesterol (mol%)
L10	10	90	0
L5	5	95	0
CH5	5	70	25
L2,5	2,5	97,5	0
CH2,5	2,5	72,5	25

4.2.2 Čištění extruderu

Všechny části extruderu byly opláchnuty v destilované vodě (dále jen dH₂O) a následně v methanolu (dále MeOH) (gumičky pouze zlehka a ihned omyty dH₂O). Po důkladném smytí MeOH pomocí dH₂O byly všechny části extruderu (kromě gumiček) a sklené části mikropipet sonikovány po dobu 30 minut v dH₂O při 30°C. Extruder byl následně složen a opakovaně promyt MiliQ vodou, která byla následně nahrazena čerstvě rozmraženým 105 mOsm glukózovým pufrům (>60 mM glukózy, 10 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7,4, filtrován přes póry s velikostí 0,22 μm). Po vložení polykarbonátové membrány se 100 nm velkými póry byl extruder ještě několikrát propláchnut glukózovým pufrům pro důkladné zbavení se bublinek vzduchu. Současně byla označena skleněná mikropipeta, která bude po dokončení extruze obsahovat vezikuly. Do extruderu byly po vložení polykarbonátové membrány všechny roztoky vnášeny jenom z jedné strany (neoznačená skleněná mikropipeta) pro zabránění znečištění LUV pomocí prachových či jiných částic, které by následně mohly vnášet chyby do měření pomocí DLS.

4.2.3 Příprava vezikul

Po odpaření organických rozpouštědel v exsikátoru byl lipidový film hydratován 105 mOsm glukózovým pufrům. MLV byly vytvořeny agitací na vortexu po dobu 5 minut. Při nedostatečném omytí lipidového filmu z povrchu byla zkumavka s částečně hydratovaným lipidovým filmem sonikována asi 1 minutu. Následovalo opakování postupu vortexování a sonikace až do úplné hydratace filmu. Zakalení roztoku potvrzovalo formaci

MLV. Roztok MLV byl pak opakovaně extrudován (21x) do vytvoření LUV s průměrem 100 nm. V průběhu extruze bylo možné sledovat postupné mizení zákalu extrudovaného roztoku. Zformované vezikuly byly následně převedeny ze skleněné mikropipety do plastové kyvety pro DLS analýzu.

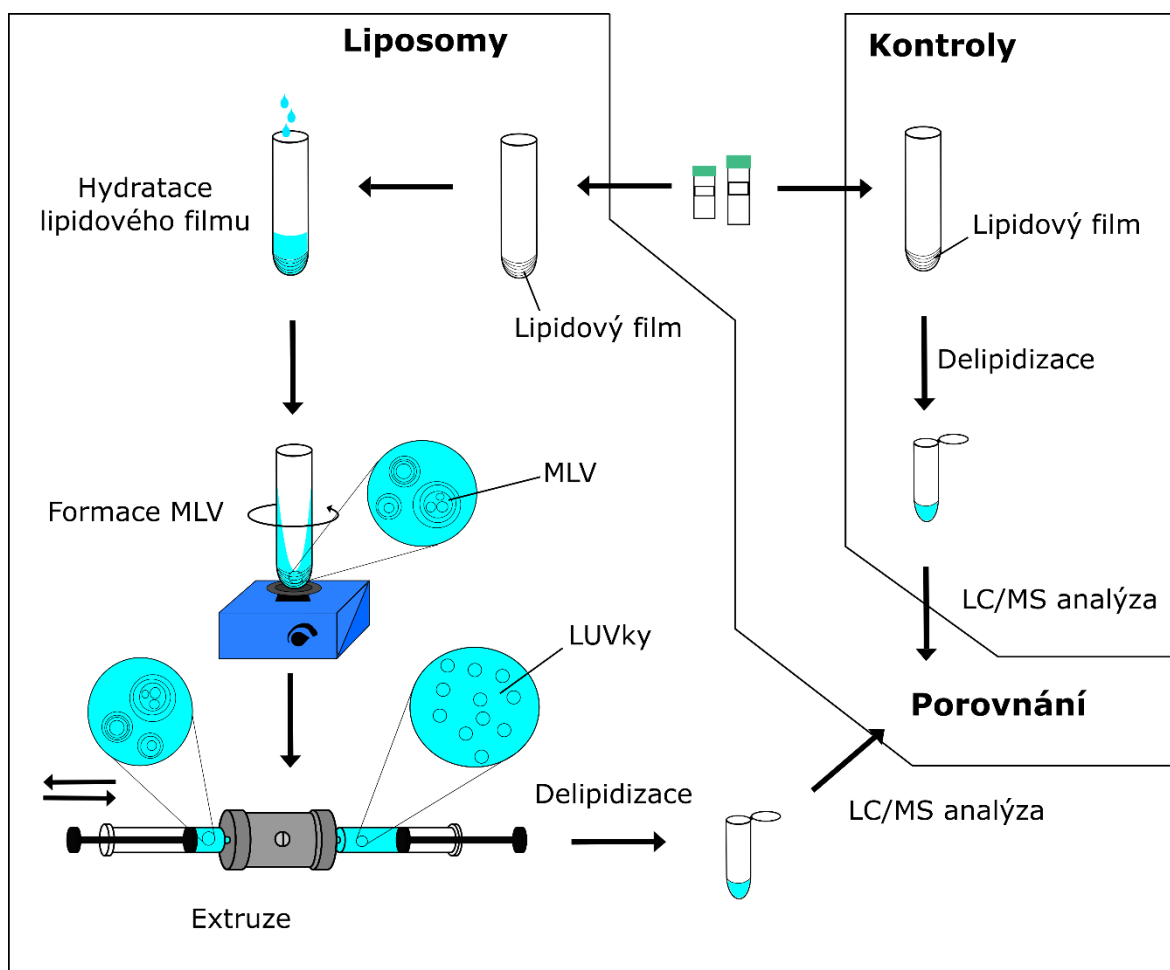
4.2.4 DLS analýza

Zformování vezikul a distribuce jejich velikostí byla zkontrolována pomocí DLS na přístroji Zetasizer Nano S (Malvern Instruments). Analýza pomocí DLS byla provedena pro vzorky obsahující 2,5 a 5 mol% LW21. Přístroj byl nastaven pro měření velikostí lipidových vezikul ve vodě. Pro daný typ vzorku přístroj automaticky přiřadí indexy lomu prostředí i samotných vezikul, viskozitu a absorbanci vzorku. Vzorky byly měřeny při 25 °C po dobu 60 s. Pro zabezpečení reprodukovatelnosti měření byla data pro rozdílné složení LUV měřena vždy třikrát.

Po kontrole formace a distribuci velikostí liposomů, byly vzorky rozalikvotovány na pět stejných částí, které byly následně delipidizovány.

4.2.5 Příprava kontrol

Ke každému vzorku LUV, bylo paralelně připraveno pět vzorků lipidových filmů (dále jen kontroly) tak, aby obsahovaly stejné množství lipidů a peptidu jako rozalikvotovány LUV za předpokladu, že všechny kroky spojené s tvorbou LUV proběhly se 100 % výtěžkem. Tyto filmy slouží jako kontrola pro stanovení množství peptidu, který se při tvorbě LUV pomocí extruze ztrácí. Příprava kontrolních lipidových filmů byla stejná jako při tvorbě lipidových filmů pro tvorbu vezikul. Přehledné schéma postupu je na obr. 8 (str. 27).



Obr. 8: Schéma postupu celého experimentu. Liposomy: Při formaci liposomů jsou lipidové filmy hydratovány a z nich jsou následně agitací na vortexu vytvořeny MLV, ze kterých jsou extruzí přes polykarbonátovou membránu se známou velikostí pórů vytvořeny LUV. Formace LUV je ještě zkontrolována pomocí DLS a roztoky LUV jsou rozalíknotovány (nezobrazeno). Po delipidizaci jsou následně vzorky analyzovány pomocí LC/MS. **Kontroly:** Lipidové filmy, které svým složením odpovídají daným LUV jsou přímo rozpuštěny v TFE s 10 % (v/v) ACN a 0,1 % (v/v) kys. mravenčí (dále FA, z angl. „formic acid“) a delipidizovány. Následuje jejich LC/MS analýza, kterou porovnáváme s daty získanými pro liposomy.

4.2.6 Delipidizace

K delipidizaci byla použita kolonka OPTI-TRAP Micro, Peptide a tři mobilní fáze ve složení, které zobrazuje tab. 2.

Tab. 2: Složení mobilních fází použitých při delipidizaci vzorků. Jedná se o objemová procenta.

Označení roztoku (mobilní fáze)	Organická složka	Organická složka (%)	Voda (%)	Kyselina mravenčí (%)
A	ACN	10	90	1
B	ACN	80	20	1
C	DCM	100	0	1

Před nanesením vzorku byla kolonka přomýta 3x MeOH a následně 5x roztokem A. Vzorek byl na kolonku nanášen po zředění mobilní fáze A 4x (při LUV obsahujících 2,5 mol% LW21 bylo nanášeno 250 µl, z nichž 75 µl tvořily LUV). Při nanášení vzorku na kolonku a jeho následném promytí byl eluát jímán do označené zkumavky kvůli možnosti nezachycení peptidu v kolonce. Následovalo trojnásobné promytí kolonky mobilní fází A pro dokonalé zbavení se nízkomolekulárních a ve vodě dobře rozpustných složek glukózového pufru (odsolení). Výraznou změnou podmínek eluce, a tedy promytím kolonky 1x mobilní fází C byla provedena delipidizace vzorku, při které jsme se zbavili DOPC a cholesterolu. Po promytí roztokem A následovala eluce peptidu pomocí 100 µl roztoku B, který byl jímán do označené zkumavky. Pro navrácení kolonky do původních podmínek byla ještě jednou promyta roztoky A, pak B a následně 3x A. Tenhle cyklus byl opakován pro všechny alikvoty LUV a pro přehlednost je zobrazen v tab. 3.

Tab. 3: Delipidizační kroky

Pořadí	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Mobilní fáze	A + vzorek.	A	C	A	B	A	B	A
Počet promytí	1x	3x	1x	1x	1x	1x	1x	3x
Objem (µl)	různý	250	250	250	100	250	250	250
Jímání	ano	1x ano	ne	ne	ano	ne	ne	ne

Po delipidizaci byly vzorky vysušeny ve vakuované centrifuze (Eppendorf Concentrator Plus) a zmrazeny přes noc na -80 °C.

4.2.7 Příprava vzorků pro LC/MS analýzu

Po rozmražení byly vysušené a delipidizované vzorky rozpuštěny v 5 µl TFE agitací na vortexu a sonikací. Následně bylo přidáno 20 µl 1 % (v/v) ACN s 0,1 % (v/v) FA a vzorky byly opět sonikovány a vortexovány. Pro možnost rozlišit signál z delipidizovaných vzorků od signálů z použitých rozpouštědel byl současně připraven slepý pokus obsahující 20 % (v/v) TFE a zbytek 1 % (v/v) ACN s 0,1 % (v/v) FA. Slepý pokus byl také používán na zamezení/sledování přenosu peptidu mezi jednotlivými sériemi analýz (z angl. „carryover“). Byla také připravena kalibrační řada peptidu LW21 o známé koncentraci (tab. 4, str. 29) pro kvantifikaci množství peptidů v jednotlivých vzorcích pomocí vnějšího standardu. Takto připravené vzorky byly následně převedeny z plastových mikrozkuvek do vialek vhodných pro nástřik pomocí autosampléru v HPLC přístroji (Agilent 1 200, Agilent Technologies) a analyzovány.

Tab. 4: Kalibrační řada peptidu LW21.

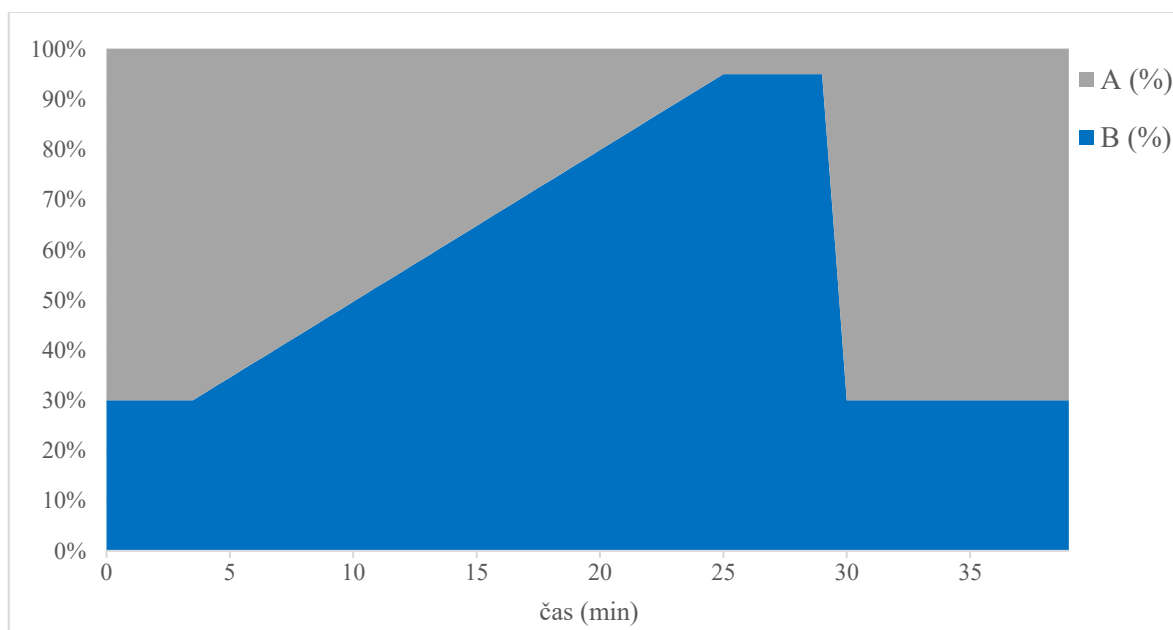
Vzorek	c _{LW21} (ng/μl)
P1x	200
P0,1x	20
P0,001x	2

4.2.8 Podmínky separace HPLC

Při analýze pomocí HPLC byly vzorky nejprve naneseny na chromatografickou odsolovací patronu (C18) v 5 % (v/v) ACN s 0,1 % (v/v) FA a z ní následně ve směru opačném k nanášení vymývány gradientem mobilních fází A a B, popsaných v tab. 5. V snaze zabránit dalším ztrátám peptidu bylo nanášení na záchytnou kolonu u vzorků obsahujících 2,5 mol% LW21 vynecháno. Chromatografická separace probíhala na koloně s reverzní fází Zorbax SB-C18, 0,3x150 mm 3,5 micron (Agilent Technologies) při 50 °C, průtoku 10 μl/min a tlaku 350 bar. Zvýšením teploty dochází k snížení viskozity mobilních fází a snížení interakcí analytů s nosičem, systém vykazuje lepší separační vlastnosti pro hydrofobní analyty. Gradient mobilních fází je zobrazen na obr. 9.

Tab. 5: Složení mobilních fází použitých pro separaci na HPLC. Jedná se o objemová procenta.

Označení roztoku (mobilní fáze)	ACN (%)	Voda (%)	FA (%)
A	2	98	0,1
B	98	2	0,1

**Obr. 9: Gradient mobilních fází A a B použitý při chromatografické analýze vzorků s 5 mol% LW21. Na ose y jsou uvedena objemová procenta.**

Pro kvantifikaci bylo na kolonu nanášeno vždy stejné množství delipidizovaných vzorků. Pokud bylo nanášeno menší množství, nejedná se o delipidizované vzorky a jde o snahu získat nižší intenzitu signálu z MS pro zabránění nelineární odezvě detektoru při vysokých koncentracích vzorků. Pořadí vzorků je zobrazeno v tab. 7.

Tab. 7: Pořadí vzorků při HPLC separaci delipidizovaných vzorků s 5 mol% LW21. Vzorky označeny P odpovídají kalibračnímu roztoku peptidu, L vzorkům liposomů bez cholesterolu a D jsou jejich kontroly. C jsou pak liposomy s cholesterolem a DC jejich kontroly.

Vzorek	Množství (μl)
Blank0	2
P0,01x	1
P0,1x	1
P1x	1
Blank1	2
L1-5	2
Blank2	2
D1-5	2
Blank3	2
C1-5	2
Blank4	2
DC1-5	2

4.2.9 Podmínky MS měření

Jako detektor HPLC analýzy byl použit 15T-solarix XR FT-ICR s ESI ionizací (Bruker Daltonik). Před měřením byla provedena kalibrace m/z na ionty klastrů sodné soli kys. trifluoroctové. MS spektra pozitivních iontů byla sbírána v rozmezí 250–2 500 m/z v průběhu 5–30 minuty gradientu. Pro zabezpečení stálé kalibrace v průběhu celého měření bylo spektrum online kalibrováno pomocí pár kalibračního roztoku Agilent ESI tuning mix (Agilent Technologies), který v hmotnostních spektrech přidával dva ionty o m/z 622,0289 a 922,0100.

4.2.10 Analýza MS dat

Data ze všech měření byla analyzována pomocí softwaru DataAnalysis 4.2 od výrobce hmotnostního spektrometru. Pro celkový přehled HPLC analýzy a čistoty vzorku byl nejprve zobrazen chromatogram přes všechny ionty (dále jen TIC, z angl. „total ion chromatogram“). Následně byly zobrazovány hmotnostní spektra přes celý chromatogram až do nalezení píku odpovídajícího našemu peptidu (LW21). Teoretické m/z iontů našeho peptidu bylo možné získat ze známé sekvence AK pomocí softwaru mMass⁴⁶. Jejich přehled je zobrazen

v tab. 8. Proto bylo možné určit, který pík v TIC odpovídá LW21. Pro přehlednost a jednoduchost dalších analýz byl následně zobrazen chromatogram přes nejintenzivnější monoisotopickou hmotu peptidu LW21 (dále jen EIC, z angl. „extracted ion chromatogram“) v iontové sérii $[M+5H]^{5+}$, čímž vznikl chromatogram s jedním píkem. Následně bylo zobrazeno spektrum v maximální intenzitě EIC. Z hmotnostního spektra pak byly odečítány intenzity jednotlivých monoizotopických iontů v iontových sériích $[M+6H]^{6+}$, $[M+5H]^{5+}$, $[M+4H]^{4+}$ a $[M+3H]^{3+}$, které měli m/z rovno teoretickým hodnotám uvedeným v tab. 8. Protože byla použita ionizace pomocí ESI, spektrum jedné molekuly peptidu obsahovalo několik iontových sérií, které musí být pro zajištění správné kvantifikace sečteny. Pro vyřazení výsledků s hrubou chybou byl prvotně použit Q-test. Jeho definice je ale závislá na rozptylu hodnot, a proto některé z analýz nebyly vyřazeny ani když se v celkové intenzitě peptidu odlišovaly o řád. Pro vyřazení analýz tak byla stanovena hraniční hodnota, podle které byly analýzy vyřazeny. Když byla celková intenzita iontů některé z analýz dané série 2,5x nižší než v analýze s maximální intenzitou, daná analýza byla z výpočtu inkorporace vyloučena. Pro jednotlivé sady měření byla zbylá data zprůměrována a následně bylo porovnáno množství peptidu v kontrolách a LUV vynesemím do grafu pro zobrazení množství peptidu, který byl při tvorbě lipidových vezikul zachován. Protože v některých analýzách došlo k rozšíření píků peptidu, byla provedena také analýza pomocí integrace chromatografických píků (získáním spektra z plochy pod křivkou) a porovnána s analýzou odečítání intenzit z maxima píků (provedeno u LUV s 5 mol% LW21).

Tab. 8: Teoretický poměr m/z iontů peptidu LW21 získaný pomocí nástroje mMass. Zobrazeny jsou pouze ionty, které byly pozorované na hmotnostním spektru.

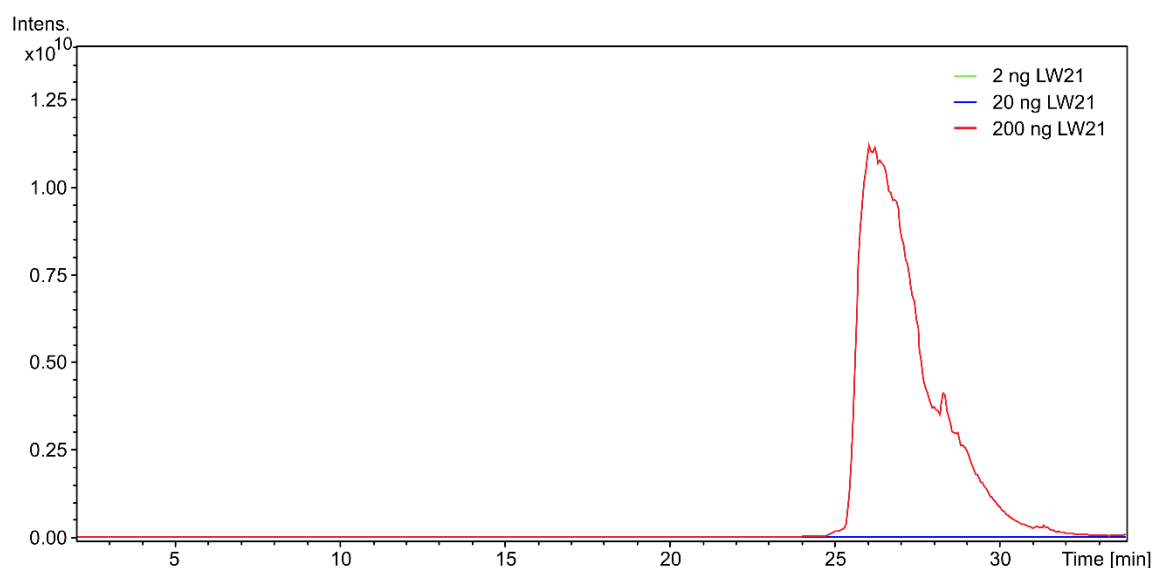
Označení iontu	Moizotopický m/z	Průměrný m/z
$[M+3H]^{3+}$	1 373,2033	1 374,0790
$[M+4H]^{4+}$	1 030,1543	1 030,8111
$[M+5H]^{5+}$	824,3249	824,8503
$[M+6H]^{6+}$	687,1053	687,5432

5 Výsledky

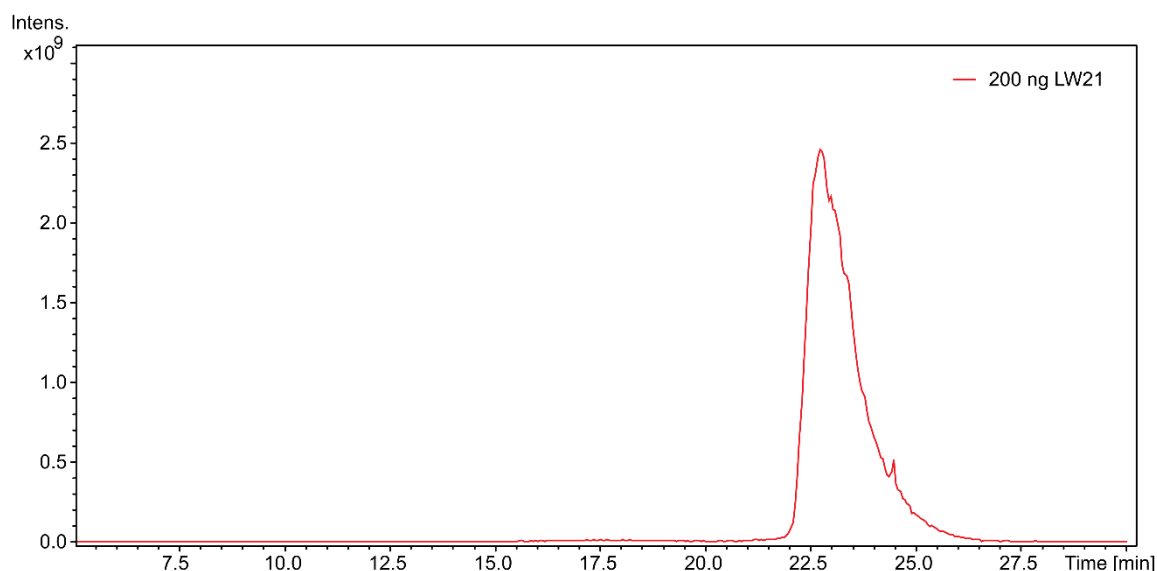
5.1 Kalibrační měření peptidu LW21

Pro absolutní stanovení peptidu v analyzovaných vzorcích bylo původně plánováno využití metody vnějšího standardu, a proto byla připravena kalibrační řada peptidu LW21 s koncentrací 2, 20 a 200 ng/μl (viz. tab. 4, str. 29). Nanášeno bylo vždy po 1 μl a pro jednoduchost další kvantifikace bude nanosené množství uváděno vždy v nanogramech. Kalibrační měření byla provedena vždy před analýzou jednotlivých delipidizovaných vzorků, aby byla pokaždé zabezpečena odezva přístroje odpovídající jeho momentálnímu stavu. Rozdíl v intenzitách při nanášení stejného množství peptidu můžeme vidět při porovnání kalibračních měření na obr. 11 (str. 33) s těmi na obr. 10 a 12 (str. 33). Intenzita stejného množství peptidu na obr. 11 (str. 33) je 5x nižší.

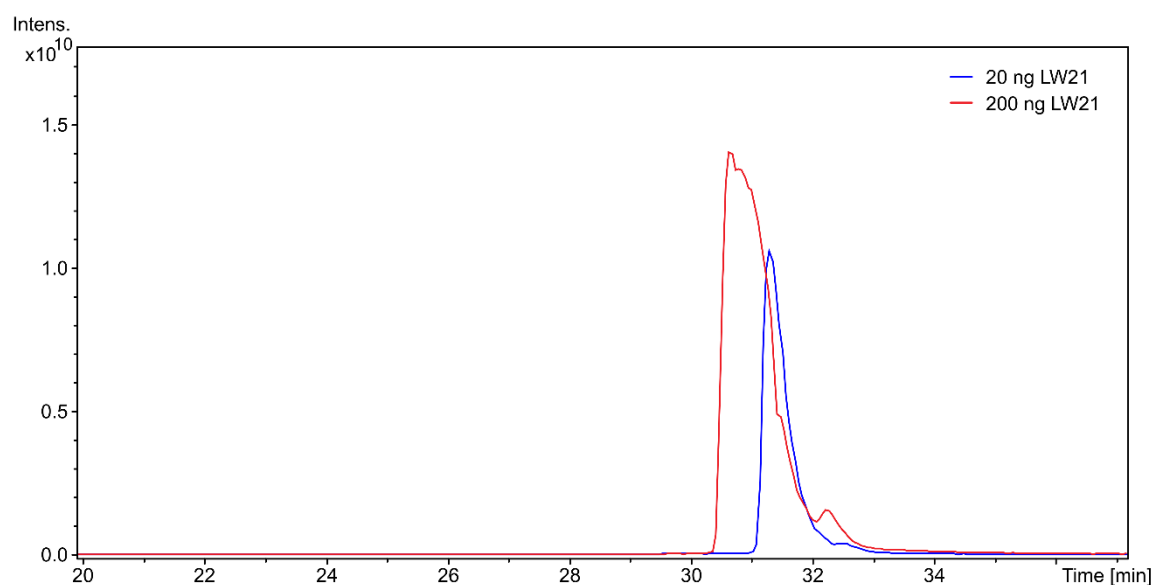
Kalibrační roztoky peptidu byly před vzorky s 2,5 a 5 mol% nanášeny od nejvyšší po nejvyšší koncentraci pro zabránění přenesení peptidu z předchozí HPLC analýzy. U těchto vzorků kalibrační měření s 2 a 20 ng peptidu neobsahovaly žádný nebo obsahovaly zanedbatelný signál peptidu. Pro ilustraci jsou zobrazeny jenom na obr. 10 a ve zbylých EIC (obr. 11-12, str. 33) zanedbatelné signály zobrazeny nejsou. Kalibrační řada peptidu před HPLC analýzou vzorků obsahujících 10 mol% peptidu byla chybně nanášena sestupně, tedy od nejvyšší po nejvyšší množství a EIC při nanesení 20 ng (obr. 12, str. 33) obsahoval značný signál peptidu. Z toho je možné usoudit, že při nanesení peptidu v nadbytku dochází k přenosu z předchozí analýzy.



Obr. 10: Chromatogramy kalibrační řady peptidu LW21 o různé koncentraci, před měřením LUV s 2,5 mol% LW21. Jde o EIC pro iont $[M+5H]^{5+}$, zelená křivka je chromatogram peptidu o celkovém množství 2 ng, modrá pro 20 ng a červená pro 200 ng.



Obr. 11: Chromatogram kalibrační řady peptidu LW21 o různé koncentraci, před měřením LUV s 5 mol% LW21. Jde o EIC pro iont $[M+5H]^{5+}$, červená křivka je chromatogram peptidu o celkovém množství 200 ng. Při nanášení 2 a 20 ng peptidu HPLC analýzy kalibrační řady neobsahovaly žádný signál, proto nejsou v grafu zobrazeny.



Obr. 12: Chromatogramy kalibrační řady peptidu LW21 o různé koncentraci, před měřením LUV s 10 mol% LW21. Jde o EIC pro iont $[M+5H]^{5+}$, modrá křivka je chromatogram peptidu o celkovém množství 20 ng, červená pro 200 ng. Chybí křivka pro 2 ng peptidu, obdobně jako u předchozích měření neobsahovala signál peptidu.

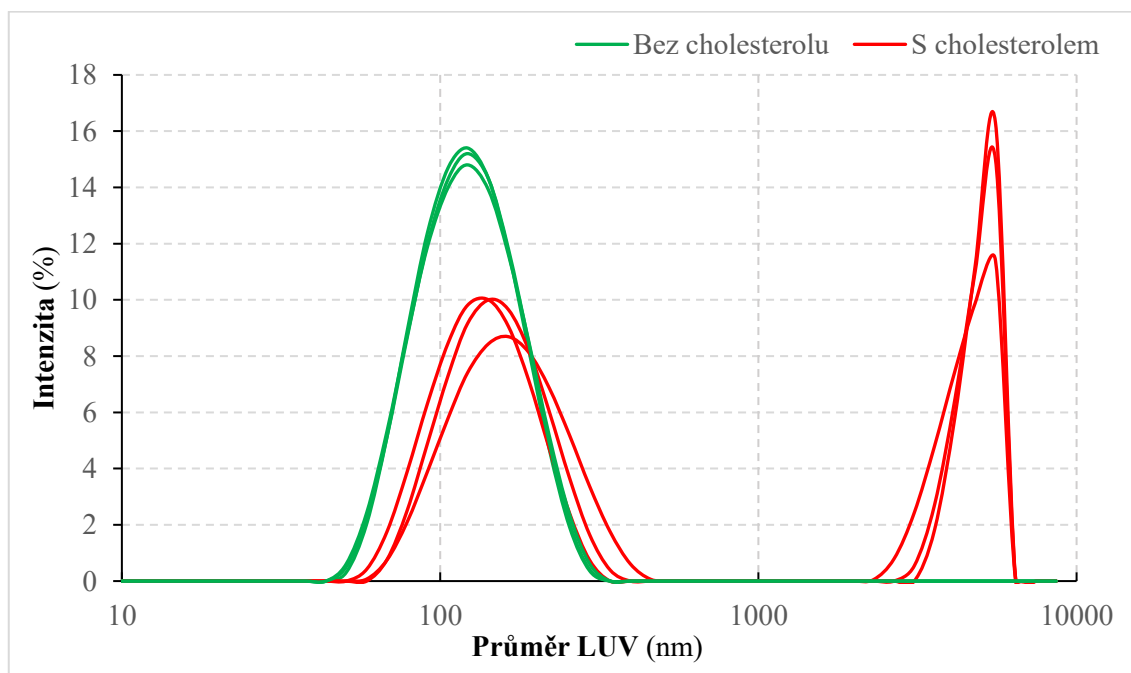
Ze získaných dat je zřejmé, že kalibrační křivka by musela být jednobodová. Museli bychom předpokládat, že odezva přístroje je v celém jeho rozsahu lineární a kalibrační křivka prochází počátkem (bod $[0,0]$). Tento předpoklad ale není správný a takto získaná koncentrace peptidu by byla velmi nepřesná, proto absolutní kvantifikace peptidu v delipidizovaných vzorcích nebyla provedena. Z těchto měření také vyplývá, že námi použitá metoda a instrumenty mají hranici citlivosti na peptid mezi 20-200 ng.

5.2 Vezikuly s 2,5 mol% LW21

5.2.1 DLS

Extruzí MLV přes polykarbonátovou membránu se 100 nm velkými póry byly z DOPC vytvořeny dva druhy liposomů obsahující 2,5 mol% LW21, které se liší přítomností 25 mol% cholesterolu (viz. tab. 1, str. 25). Kontrola formace a distribuce velikostí liposomů o výše uvedeném složení byla získána pomocí DLS na přístroji Zetasizer Nano S, na kterém je fluktuace intenzity odraženého světla online přepočítána na rozdělení velikostí částic v kyvetě. Pro obě složení bylo měření provedeno 3x a naměřené hodnoty jsou zobrazeny na obr. 13.

Z obr. 13 je zřejmé, že liposomy o velikosti blízké 100 nm byly úspěšně vytvořeny. LUV bez cholesterolu mají průměrnou velikost 129 ± 46 nm (zelené křivky) a ty, které obsahovaly také 25 mol% cholesterolu byly průměrně 158 ± 57 nm velké (červené křivky – první pík). Všechny DLS záznamy vzorků s cholesterolem, kromě samotných LUV, obsahují také částice s velikostí kolem 5 000 nm (druhý pík všech červených křivek na obr. 13). Distribuce velikostí větších částic nemá tvar normálního rozdělení a jejich pík je ostrý.

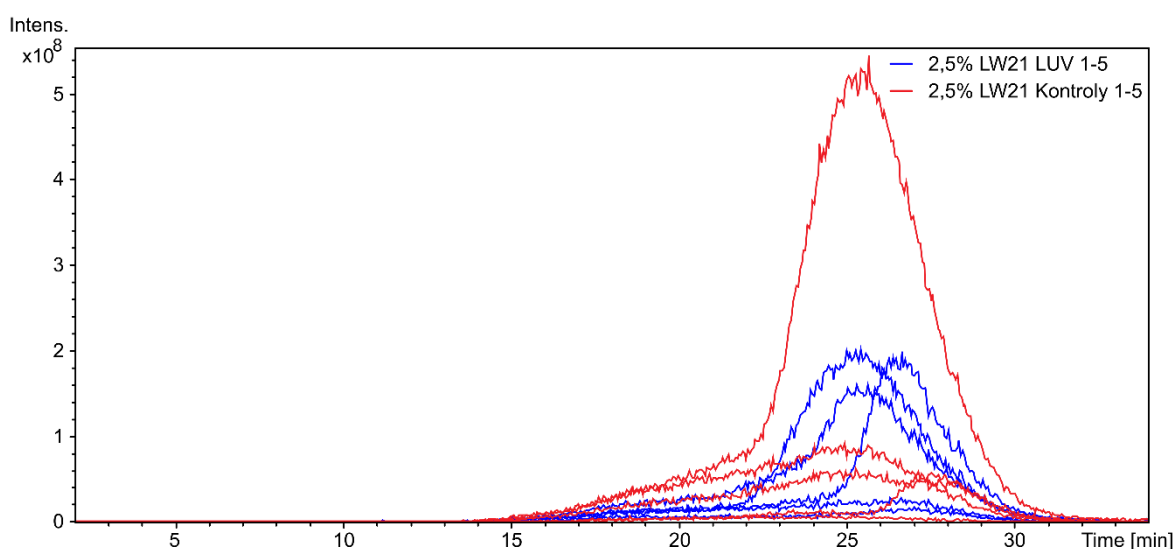


Obr. 13: Kontrola přípravy LUV z DOPC s 2,5 mol% LW21 pomocí DLS. Zobrazené křivky představují rozdělení velikosti liposomů, které byly připraveny extruzí MLV přes polykarbonátovou membránu s póry o velikosti 100 nm. Zelené křivky odpovídají LUV bez cholesterolu a červené LUV s 25 mol% cholesterolem.

5.2.2 LC/MS analýza

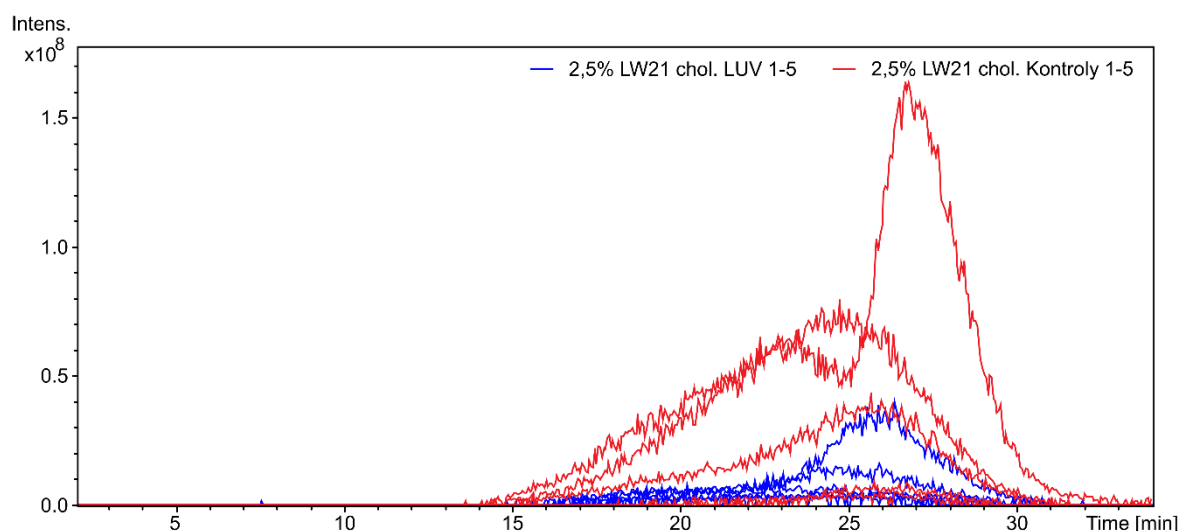
Peptid z LUV i kontrol byl delipidizován, zakoncentrován a připraven na HPLC analýzu s MS detekcí. Ve snaze o maximální zachování vzorku pro analýzu byla vyřazena záchytná kolona z HPLC systému. Intenzita signálu sledovaného iontu (EIC $[M+5H]^{5+}$) při vzorcích obsahujících 2,5 mol% LW21 (obr. 14 a 15, str. 36) ale byla u všech analýz až o 2 řády nižší v porovnání s kalibračním měřením (obr. 10, str. 32), při kterém bylo nanášeno 200 ng čistého peptidu. Teoretické množství peptidu, který byl nanášen v delipidizovaných vzorcích je ještě 2x vyšší, no velký počet kroků při přípravě vzorků na analýzu způsobuje jeho značné ztráty. To následně vede k nízkému signálu a zvyšování vlivu šumu, což můžeme sledovat na EIC všech HPLC analýz.

Na obr. 14 jsou zobrazeny EIC delipidizovaného peptidu z LUV (modrá barva) i kontrol (červená barva) s 2,5 mol% peptidu. Ze zobrazených chromatogramů je zřejmé, že množství peptidu je pouze v jedné z kontrol vyšší než ve vzorcích liposomů. To poukazuje na velký rozptyl v množství peptidu, které je při přípravě vzorků úspěšně zbaveno lipidů bez jeho ztráty. V porovnání se zbylými analýzami je také možné si všimnout velké šířky všech píků, kde například pík EIC u analýzy s nejintenzivnějším signálem z kontrolních vzorků je široký zhruba 8 minut (pokud není brán v úvahu počáteční nárůst intenzity peptidu od 15 minuty). V analýzách, kde byl peptid nanášen přes záchytnou kolonu je šířka chromatografického píku i 3x nižší. Semikvantitativní analýza z těchto dat by nebyla přesná a ze statistického hlediska by bylo nutné ji několikrát zopakovat pro ujištění se o reprodukovatelnosti a správnosti dat.



Obr. 14: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, ze všech LC/MS analýz delipidizovaných LUV (modré křivky) i kontrol (červené křivky) s 2,5 mol% LW21. Intenzita signálu (osa y) je v porovnání s kalibračním měřením (obr. 10, str. 32) až o 2 řády nižší.

Na obr. 15 můžeme vidět LC/MS analýzy delipidizovaných LUV a kontrol s 25 mol% cholesterolu. Intenzity EIC pro iont $[M+5H]^{5+}$ peptidu LW21 jsou v porovnání s daty bez cholesterolu výrazně nižší. V porovnání s kalibračním měřením je to pro vzorky LUV až 3 řády (modré křivky). U EIC kontrolních vzorků (červené křivky) můžeme na dvou analýzách sledovat až 15 minut široký pík a u jedné z analýz dokonce dvojpík stejného iontu, který není zcela rozlišený. Chromatogramy EIC jsou vytvořeny z rozmezí 0,01 m/z , a proto je jasné že jde o stejnou molekulu. Dva píky mohou být způsobeny dvěma rozdílnými konformacemi peptidu v těchto vzorcích. Obdobně jako u vzorků bez cholesterolu můžeme sledovat výrazné „zašumění“ ve všech analýzách, které je při nízké intenzitě běžné.



Obr. 15: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, ze všech LC/MS analýz delipidizovaných LUV (modré křivky) i kontrol (červené křivky) s 2,5 mol% LW21 a 25 mol% cholesterolu. Všechny analýzy jsou výrazně zašuměné a pro správnou kvantifikaci nepoužitelné.

Ze získaných dat je možné potvrdit problém s úspěšností přípravy delipidizovaného peptidu z LUV s vysokým molárním zastoupením lipidů. Všechny HPLC analýzy delipidizovaného peptidu LW21 z vezikul i kontrol, ve kterých bylo jeho zastoupení rovno 2,5 mol%, vykazují nízkou odezvu jeho iontů. Správná kvantifikace inkorporace peptidu z těchto dat tak není možná.

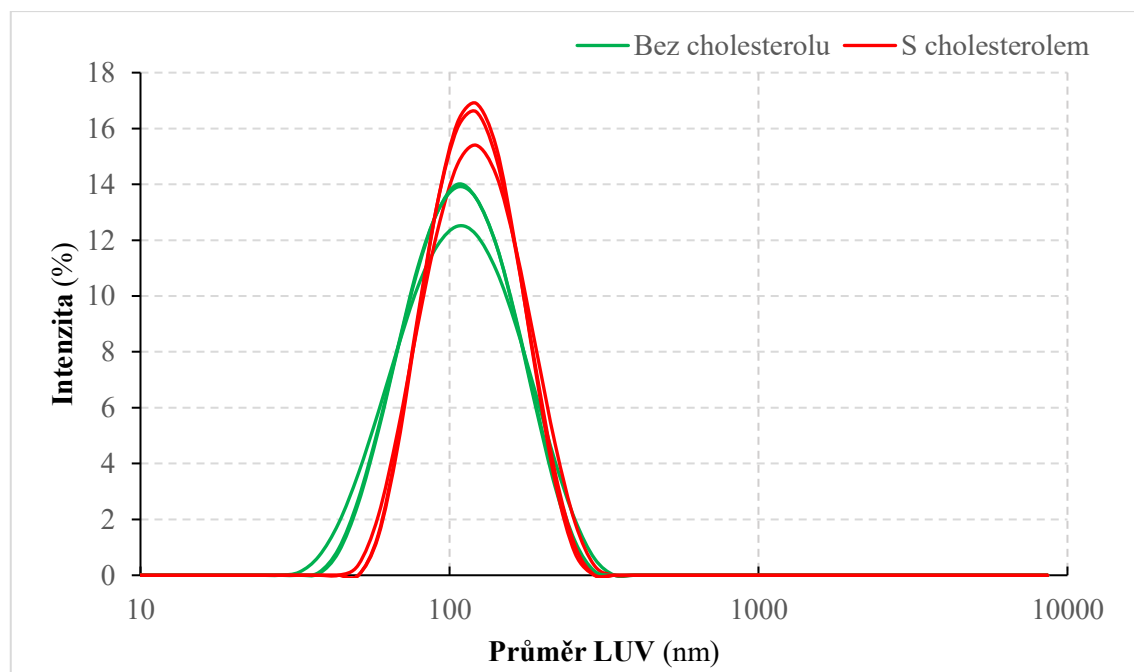
5.3 Vezikuly s 5 % LW21

5.3.1 DLS analýza

LUV s 5 mol% LW21 o různém lipidickém složení (z DOPC bez a s 25 mol% cholesterolem) byly připraveny extruzí MLV přes polykarbonátovou membránu se 100 nm velkými póry. Pomocí DLS na přístroji Zetasizer Nano S byla potvrzena jejich formace

s relativně homogenní distribucí velikostí. Pro obě složení bylo měření provedeno 3x a naměřené hodnoty jsou zobrazeny na obr. 16.

LUV bez cholesterolu měli průměr 116 ± 51 nm (zelené křivky na obr. 16) a ty s cholesterolem 127 ± 45 nm (červené křivky na obr. 16). Všechny analýzy obsahují pouze jeden pík a v porovnání se vzorky s 2,5 mol% LW21 neobsahují v měřeném rozsahu žádné jiné částice.



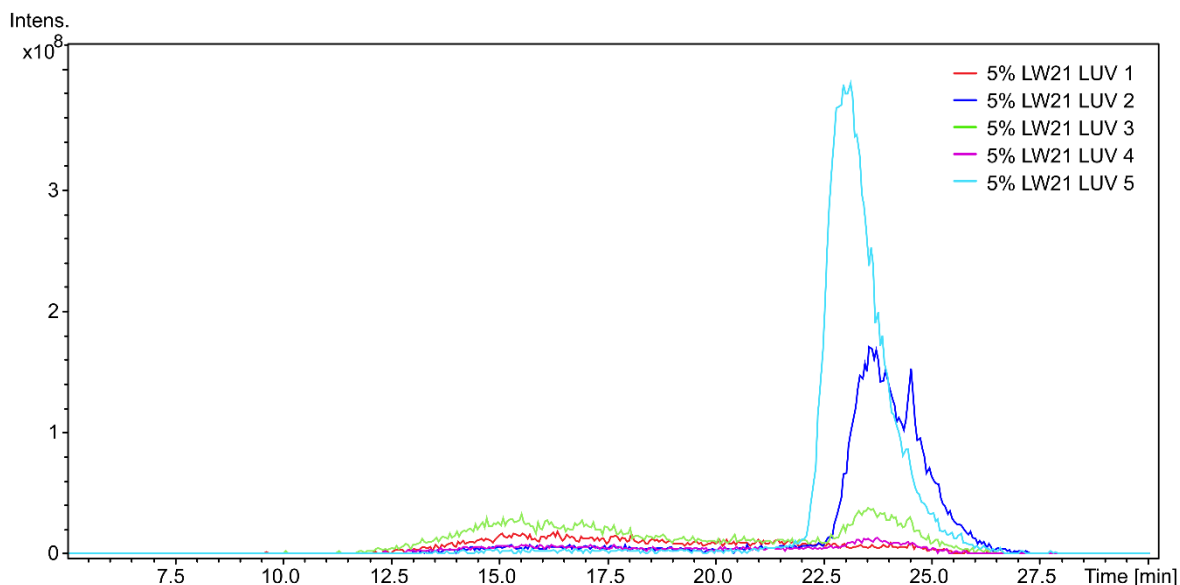
Obr. 16: Kontrola přípravy LUV z DOPC s 5 mol% LW21 pomocí DLS. Zobrazeny křivky představují rozdělení velikosti liposomů, které byly připraveny extruzí MLV přes polykarbonátovou membránu s póry o velikosti 100 nm. Zelené křivky odpovídají LUV bez cholesterolu a červené LUV s 25 mol% cholesterolem.

5.3.2 LC/MS analýza

Peptid z LUV i kontrol byl delipidizován, zakoncentrován a připraven na HPLC analýzu s detekcí pomocí MS. Intenzita signálu sledovaného iontu (EIC $[M+5H]^{5+}$) u vzorků obsahujících 5 mol% LW21 je u většiny HPLC analýz (obr. 18-20, str. 39 a 40) srovnatelná s kalibračním měřením (obr. 11, str. 33), při kterém bylo naneseno 200 ng peptidu. U série analýz delipidizovaného peptidu z LUV (obr. 17, str. 38) je intenzita zhruba o řád nižší. Teoretické množství peptidu, které bylo nanášeno v delipidizovaných vzorcích je 400 ng, za předpokladu, že k žádným ztrátám peptidu v procesu přípravy vzorků nedochází.

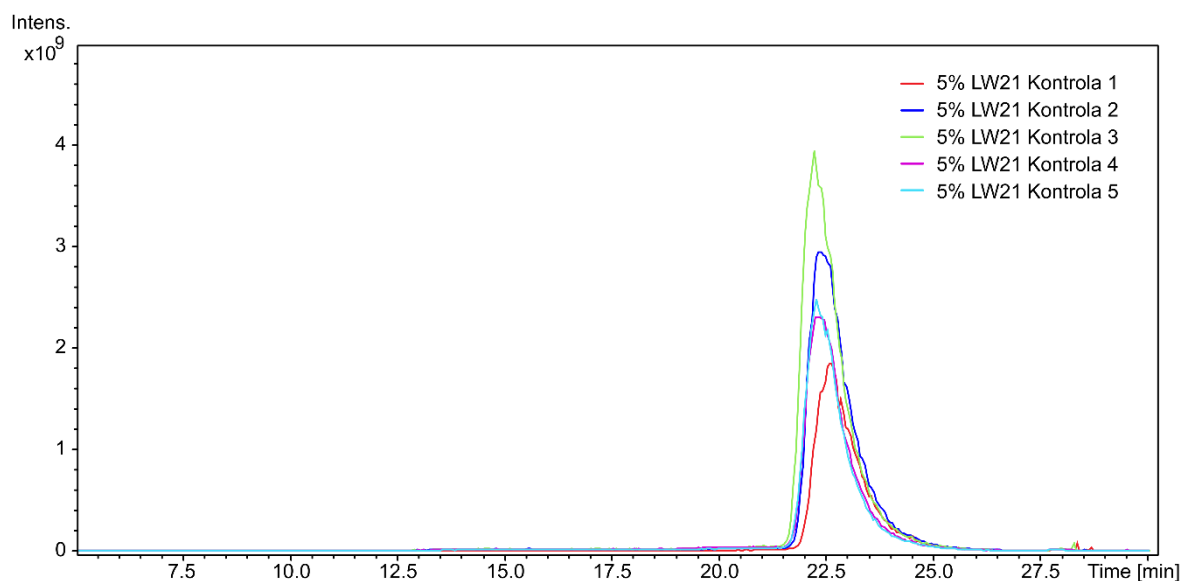
Všech pět analýz delipidizovaného peptidu z LUV, ve kterých byl jeho výchozí molární zlomek roven 0,05, vykazuje v porovnání se zbylými analýzami se stejným množstvím peptidu velmi nízký signál (obr. 17, str. 38). V průběhu přípravy vzorků této série měření

byla ztracena značná část inkorporovaného peptidu a proces delipidizace těchto vzorků nebyl zcela úspěšný. Jedině analýzy 2 a 5 (modrá a světle modrá barva) splňují hraniční podmínku, a proto byly použity pro stanovení inkorporace peptidu do LUV. Zbylé analýzy byly vyřazeny.



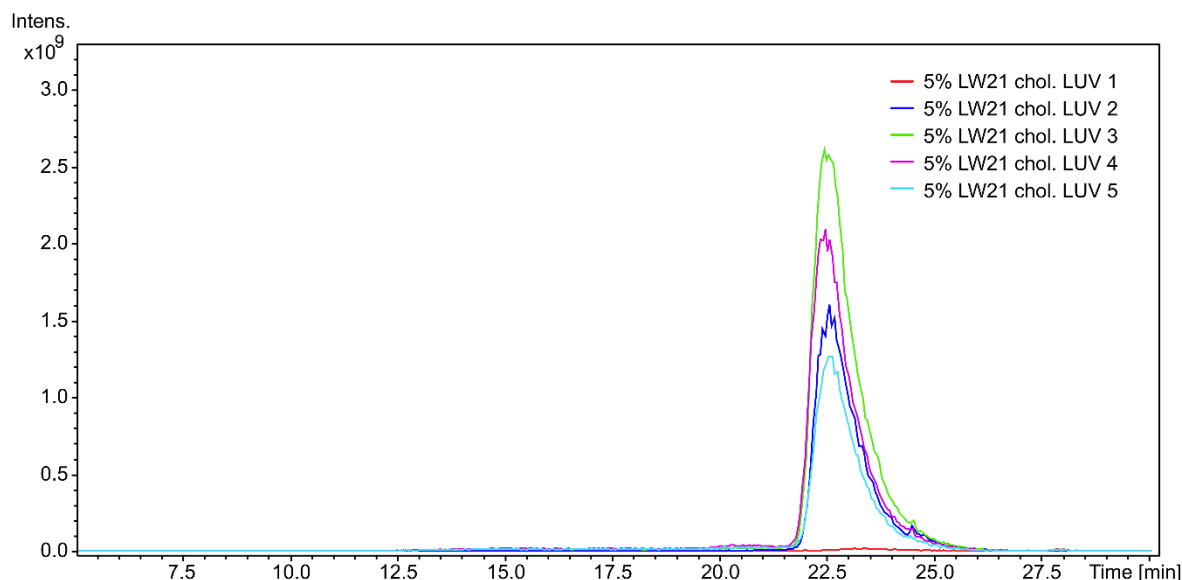
Obr. 17: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, z LC/MS analýz delipidizovaných LUV s 5 mol% LW21. Analýzy 1, 3 a 4 (červená, zelená a purpurová) vykazovaly signál, který byl nižší než stanovená hraniční hodnota a z výpočtu inkorporace byly vyřazeny.

Proces delipidizace kontrolních vzorků se stejným složením (5 mol% LW21 a 95 mol% DOPC) byl úspěšnější a všechny analýzy vykazovaly signál peptidu. EIC těchto vzorků jsou zobrazeny na obr. 18 (str. 39). Aplikací hraniční podmínky prošla všechna měření této série, a proto nebyla vyřazena žádná z HPLC analýz. Při porovnání celkových intenzit EIC LUV a kontrol ale vidíme až řádový rozdíl. Vynesení rozdílu do grafu je zobrazeno na obr. 21 a 22 (str. 41).



Obr. 18: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, z LC/MS analýz delipidizovaných kontrol s 5 mol% LW21. Všechny analýzy prošly aplikací hraniční podmínky a žádná nebyla z výpočtů inkorporace vyřazena.

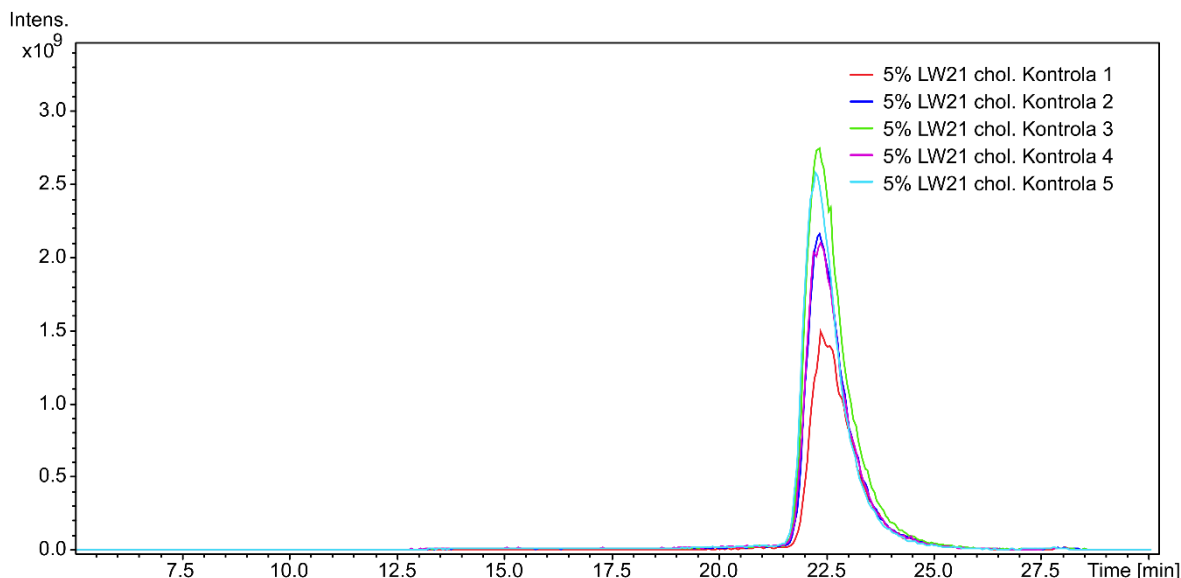
Dále byl analyzován peptid z LUV, které obsahovaly kromě DOPC a 5 mol% LW21 také 25 mol% cholesterolu. Ze získaných EIC (obr. 19) je zřejmé, že z výpočtů inkorporace byla vyřazena analýza 1 (červená barva), která v porovnání s ostatními analýzami vykazovala signál nižší než stanovená okrajová podmínka.



Obr. 19: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, z LC/MS analýz delipidizovaných LUV s 5 mol% LW21 a 25 mol% cholesterolu. Celková intenzita iontů peptidu v analýze 1 (červená) byla víc než 2,5x nižší než u analýzy 3 (světle zelená), nesplňuje proto hraniční podmínku a z výpočtu inkorporace peptidu byla vyřazena.

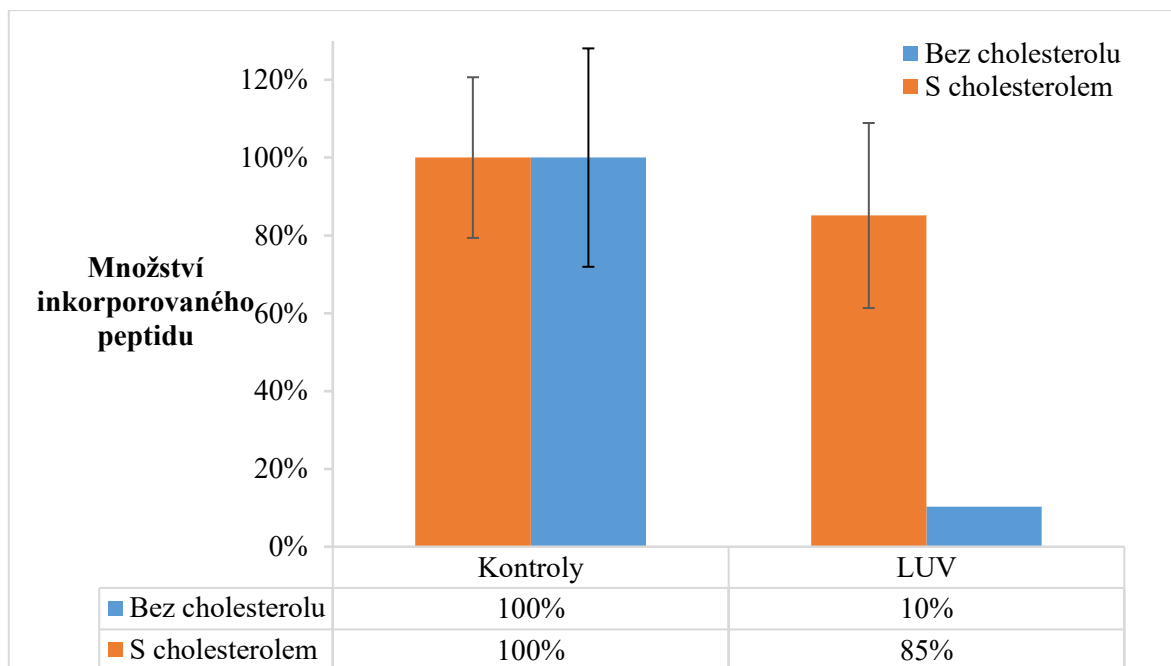
EIC z HPLC analýzy kontrolních vzorků obsahujících 5 mol% LW21, 25 mol% cholesterolu a 70 mol% DOPC jsou zobrazeny na obr. 20 (str. 40). Žádná z analýz se svým

signálem výrazně nelišila a všechna data získána pro tyto vzorky byla využita pro stanovení inkorporace peptidu do extruzí připravených LUV.

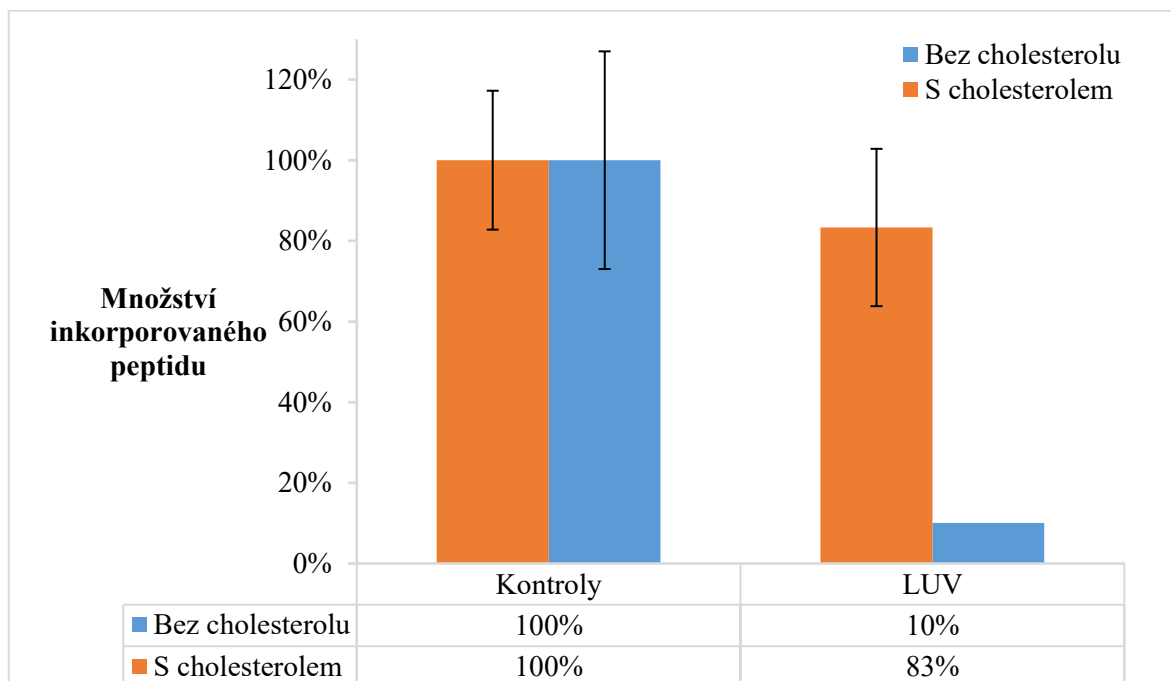


Obr. 20: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, z LC/MS analýz delipidizovaných kontrol s 5 mol% LW21 a 25 mol% cholesterolu. Žádná z analýz nebyla z výpočtů inkorporace vyřazena.

Pro zajištění správné interpretace naměřených dat bylo také porovnáno jejich různé zpracování. Pro kvantifikaci pomocí HPLC je možné dosáhnout stejných výsledků při odečítání maximální intenzity (výška daného píku) a plochy pod křivkou. Pro zabezpečení opakovatelnosti je ale lepší využít plochu pod křivkou, obzvláště když píky sledovaného analytu nejsou středově symetrické a jejich výšky se mění, plocha zůstává nezměněná. V případě dat na obr. 17-20 (str. 38-40) je zřejmé, že dochází k „chvostování“ (z angl. „tailing“), a proto byla porovnána informace o inkorporaci peptidu získána z výšky a plochy píků ve všech sériích analýz, které byly provedeny na vzorcích s 5 mol% LW21. Na obr. 21 (str. 41) je inkorporované množství peptidu z výšky píků a na obr. 22 (str. 41) z plochy pod křivkou. Grafy na obou obrázcích jsou vyneseny tak, aby byla porovnána inkorporace s a bez cholesterolu. Porovnáním obou metod zpracování dat je zřejmé, že inkorporace může být počítána oběma metodami bez výrazných rozdílů. Měření bez cholesterolu bylo zřejmě ovlivněno chybou v přípravě vzorků.



Obr. 21: Porovnání inkorporace 5 mol% LW21 do vezikul s cholesterolem a bez něho na základě intenzity signálu v maximální výšce chromatografického píku. Výsledky byly získány semikvantitativně porovnáním množství delipidizovaného peptidu z kontrol a LUV. Měření bylo provedeno pomocí LC/MS analýzy a množství odpovídá průměrné normalizované intenzitě signálu LW21, který byl odečten z výšky chromatografického píku pro $[M+5H]^{5+}$. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylku zprůměrovaných hodnot pro jednotlivé série měření, když byl počet úspěšných měření větší než 2.



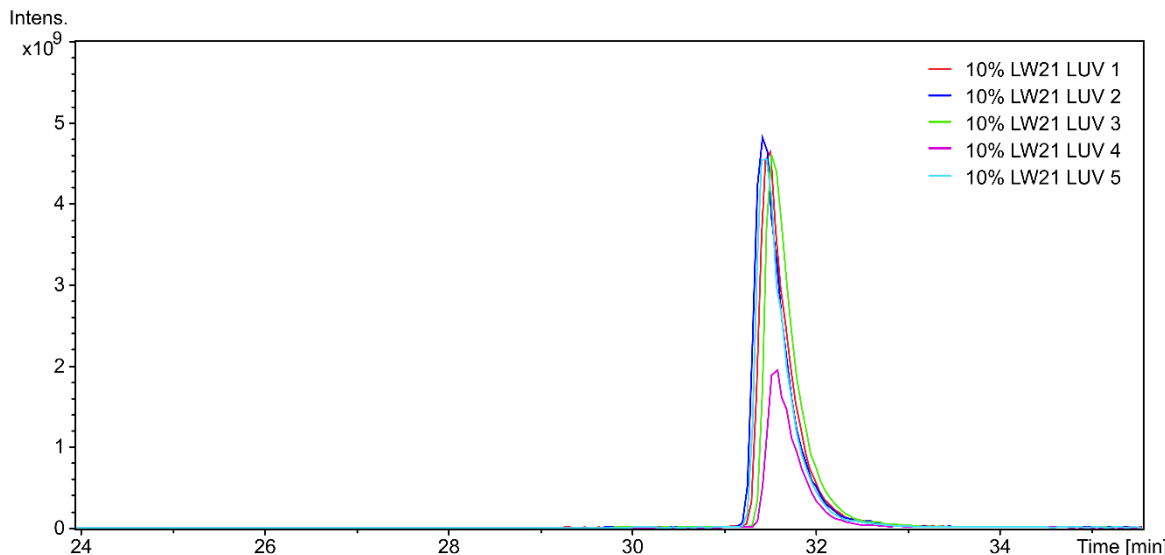
Obr. 22: Porovnání inkorporace 5 mol% LW21 do vezikul s cholesterolem a bez něho na bázi intenzity signálu získaného z plochy pod křivkou. Výsledky byly získány semikvantitativně porovnáním množství delipidizovaného peptidu z kontrol a LUV. Měření bylo provedeno pomocí LC/MS analýzy a množství odpovídá průměrné normalizované intenzitě signálu LW21, který byl odečten z plochy pod křivkou EIC pro iont $[M+5H]^{5+}$. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylku zprůměrovaných hodnot pro jednotlivé série měření, když byl počet úspěšných měření v sérii větší než 2.

5.4 Vezikuly s 10 % LW21

5.4.1 LC/MS analýza

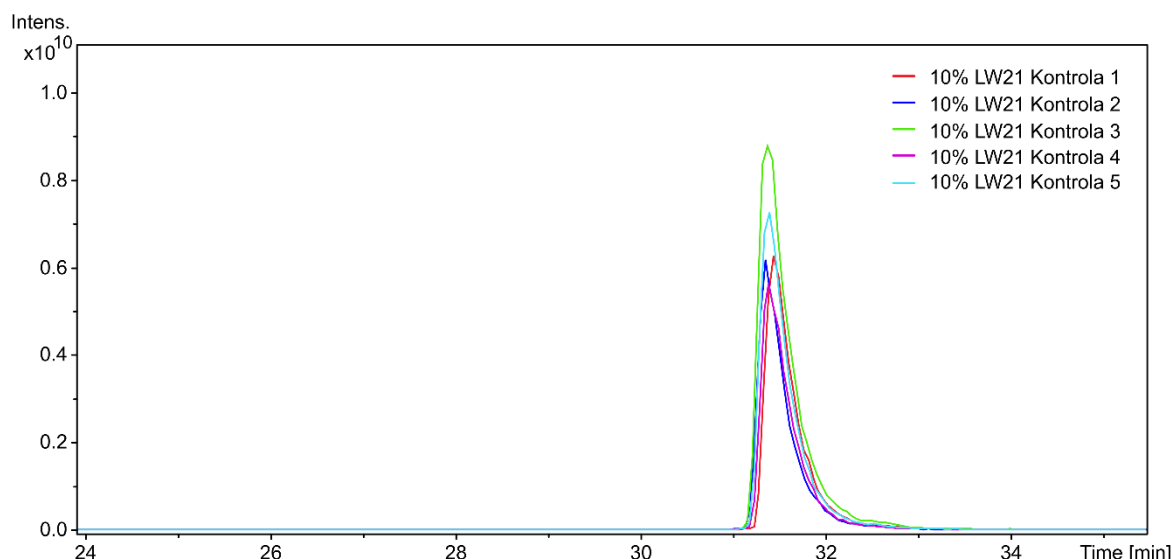
Pro analýzu inkorporace LW21 do LUV obsahujících 10 mol% LW21 byly vzorky připraveny stejně jako u předchozích složení – extruzí MLV přes polykarbonátovou membránu s velikostí pórů 100 nm. Pro kontrolu byly paralelně připraveny lipidové filmy o složení, které odpovídá alikvotám LUV. Kontrolní lipidové filmy a alikvoty LUV byly stejným postupem delipidizovány, zakoncentrovány a tak připraveny na LC/MS analýzu. Signál všech EIC z LC/MS analýz byl porovnatelný s kalibračním měřením před nanášením delipidizovaných vzorků (obr. 12, str. 33).

Výsledky všech LC/MS analýz delipidizovaného peptidu z vezikul a kontrolních lipidových filmů bez cholesterolu s 10 % LW21 daly dostatečný signál pro semikvantitativní analýzu jeho inkorporace. Na obr. 23 jsou zobrazeny EIC chromatogramy iontu peptidu $[M+5H]^{5+}$. Z výšky jednotlivých píků byla odečítána intenzita pro kvantifikaci. Z uvedených dat byla vyřazena analýza 4 (purpurová barva), protože nesplňovala hraniční podmínku (celková intenzita všech iontů peptidu byla víc než 2,5x nižší v porovnání s měřením o nejvyšší intenzitě).



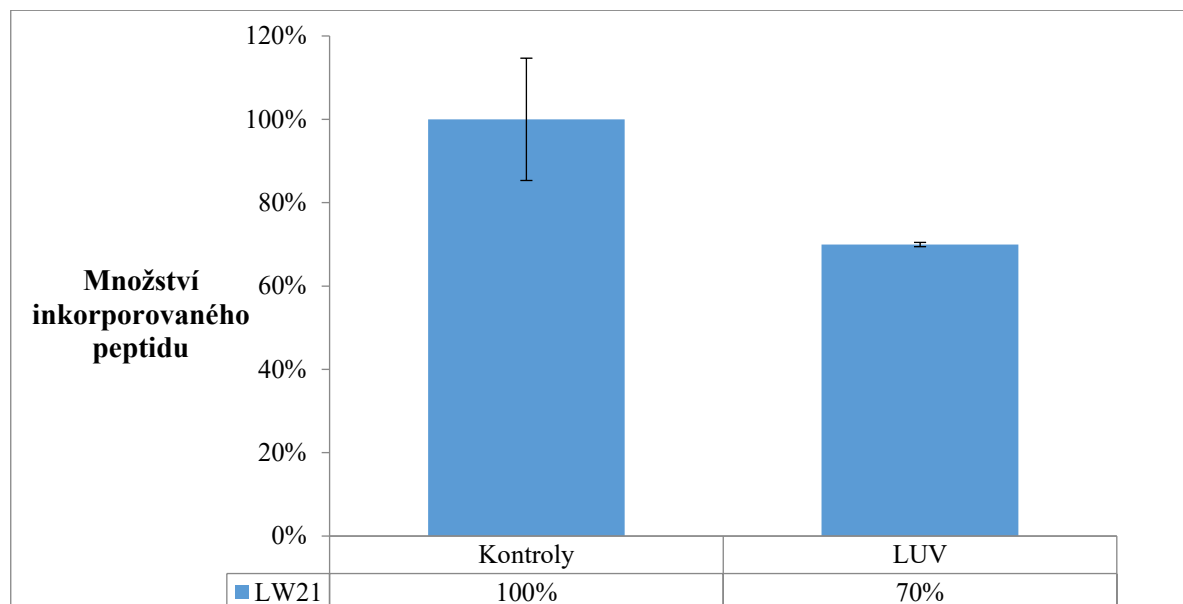
Obr. 23: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, z LC/MS analýz delipidizovaných LUV s 10 mol% LW21. Aplikací hraniční podmínky byla vyřazena analýza 4 (purpurová). Zbylé analýzy byly použity na výpočet inkorporace peptidu do vezikul.

Delipidizovaný peptid z kontrolních vzorků ve všech HPLC analýzách vykazoval výšky píků v rozmezí, které bylo stanoveno hraniční podmínkou a žádná z analýz nebyla z výpočtů inkorporace vyřazena. Analýzy z této sady měření jsou na obr. 24 (str. 43).



Obr. 24: Chromatogramy EIC pro $[M+5H]^{5+}$, ze všech LC/MS analýz delipidizovaných kontrol s 10 mol% LW21. Všechny analýzy z této série prošly aplikací hraniční podmínky a žádná nebyla z výpočtů inkorporace vyřazena.

Z porovnání kvantifikace pomocí výšky píků a plochy pod křivkou je zřejmé, že dosáhneme velmi podobných výsledků inkorporace v obou případech (obr. 21 a 22, str. 41). Pro počáteční složení, při kterém byl molární zlomek peptidu roven 0,1, již analýza z plochy pod křivkou provedena nebyla a zobrazená data byla získána z výšky píků. Množství inkorporovaného peptidu do LUV z DOPC je pro vzorek s 10 % LW21 rovno 70 % (obr. 25).



Obr. 25: Inkorporace 10 mol% LW21 do LUV obsahujících DOPC. Výsledky byly získány semikvantitativně porovnáním množství delipidizovaného peptidu z kontrol a LUV. Měření bylo provedeno pomocí LC/MS analýzy a množství odpovídá průměrné normalizované intenzitě signálu LW21, který byl odečten z výšky chromatografického píku pro $[M+5H]^{5+}$. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylku zprůměrovaných hodnot pro jednotlivé série měření, pokud byl počet úspěšných měření větší než 2.

6 Diskuse

Inkorporace syntetického peptidu do modelových membrán byla v minulosti sledována pomocí spektrálních technik, např. fluorescence²⁰, nebo pomocí infračervené spektroskopie³⁰. V uvedených studiích byly porovnávány signály fluorescence peptidu (obsahující Trp) nebo jeho absorpce v infračervené oblasti mezi modelovými membránami o různém složení. Kvantifikace množství peptidu, které bylo v průběhu přípravy vzorků při jednotlivých složeních ztraceno, chybí. Proto jsme navrhli využití dříve popsánoho postupu pro delipidizaci peptidu z liposomů⁴³ s následnou kvantifikací pomocí LC/MS.

Liposomy o daném složení byly vytvořeny hydratací lipidového filmu s následnou extruzí. Zastoupení lipidů a peptidu v LUV může být jednoduše modifikováno a rozdíly v inkorporaci zaznamenány pomocí citlivých technik (např. MS). Pro tuto studii byl zvolen peptid LW21 s poly-Leu hydrofobním středem, který je ohraničen páry Trp a Lys, a na obou koncích zakončen sekvencí AK z lidského TCR ζ (obr. 7, str. 17). Peptid o daném složení si při zvolené metodě přípravy vezikul zachovává helikální strukturu i po inkorporaci do membrány³⁵. Jako základní fosfolipid pro tvorbu LUV byl zvolen nenasycený DOPC, který při pokojové teplotě vytváří fluidní dvojvrstvy. Pro přiblížení daného systému k membránám eukaryot byl použit také cholesterol. Zvolený systém nevykazuje hydrofobní rozdíl mezi délkou hydrofobní části LW21 a tloušťkou dvojvrstvy²⁰.

Pro kontrolu formace LUV s 2,5 a 5 mol% LW21 byla provedena analýza částic pomocí DLS, ze které můžeme získat informaci o distribuci velikostí zformovaných vezikul. Z analýz pro všechny složení je zřejmé, že vezikuly se střední hodnotou průměru v okolí 100 nm byly úspěšně vytvořeny (obr. 13, str. 34 a obr. 16, str. 37). LUV s 2,5 mol% LW21 a 25 mol% cholesterolu jako jediné obsahovaly také částice s průměrem v okolí 5 000 nm, kterých distribuce nebyla gausovsky rozložena. Výrobce uvádí, že rozdělení podobné tomu, které bylo v této analýze sledováno můžeme přiřadit prachovým částicím. Z DLS analýz je také zřejmé, že přidavek cholesterolu zvyšuje střední hodnotu distribuce velikostí LUV. Přítomnost cholesterolu zvyšuje pevnost a elasticitu membránových struktur. Proto mohou být při opakované extruzi vytvořeny vezikuly s větším průměrem. Závislost průměru LUV z POPC na množství cholesterolu byla v minulosti pomocí DLS sledována a vykazovala stejný trend⁴⁷.

Charakterizace inkorporace peptidu měla být provedena semikvantitativně porovnáním LUV s neprocesovanými kontrolami a také absolutně, použitím vnějšího standardu,

konkrétně analýzou samotného peptidu LW21 o známém množství. Při koncentracích peptidu 2 a 20 ng/μl nebyl na kolonu nanesen peptid v rozlišitelné koncentraci (obr. 10-12, str. 32 a 33). Toto pozorování poukazuje na koncentrační limit celé metody. Data z kalibrační řady byla získána pouze při nanášení 200 ng. Ze získaných dat by kalibrační křivka musela být jednobodová (prochází počátkem) a museli bychom tedy předpokládat, že odezva přístroje je v celém jeho rozsahu lineární. Tenhle předpoklad ale není správný a takto získaná informace o množství peptidu by byla velmi nepřesná, proto není možné provést absolutní kvantifikaci peptidu v delipidizovaných vzorcích.

Semikvantitativní analýza byla úspěšnější. Vzorky s 10 mol% LW21 vykazovaly dostatečný poměr signálu k šumu a množství inkorporace bylo stanoveno na 70 % (obr. 25, str. 43). Při liposomech s 5 mol% peptidu byla úspěšnější delipidizace vzorků s cholesterolem, kdy bylo podle způsobu zpracování dat inkorporováno 83 nebo 85 % peptidu (obr. 21 a 22, str. 41). Liposomy s 5 mol% LW21 bez cholesterolu ale vykazovaly pouze 10 % inkorporovaného peptidu, což je v porovnání s vezikulami s cholesterolem až o 75 % méně (obr. 21 a 22, str. 41). Tak velký rozdíl neodpovídá předchozím měřením inkorporace pomocí fluorescence²⁰. Opakováním delipidizace bylo potvrzeno, že ke ztrátě peptidu došlo právě v tomto kroku přípravy vzorků, protože výška píků následných analýz byla porovnatelná s měřením LUV s cholesterolem. Ve snaze o co nejvyšší výtěžek byly ale upraveny podmínky separace a kalibrační měření, pomocí kterého by bylo možné opakované analýzy peptidu z LUV porovnat s již naměřenými chromatogramy pro kontroly, nebylo úspěšné. Ze získaných dat bylo tedy možné jen potvrdit chybu při delipidizaci, ale kvůli rozdílným podmínkám separace nebylo možné správně kvantifikovat inkorporaci (data nezobrazena). Snižování úspěšnosti delipidizace peptidu při zvyšujícím se zastoupení lipidů ve vezikulách bylo potvrzeno LC/MS analýzami vzorků s 2,5 mol% LW21. Z chromatogramů na obr. 14 a 15 (str. 35 a 36) je zřejmé, že při přípravě vzorků na analýzu dochází k velkým ztrátám peptidu na koloně a námi použitá metoda sledování inkorporace se blíží ke své limitě. Transmembránové segmenty je danou metodou možné reprodukovatelně a selektivně zbavit lipidové matrice, pokud je jejich molární zlomek vyšší než 0,05 (vezikuly s 5 mol% LW21).

Pro zvýšení účinnosti by bylo nutné pozměnit proces delipidizace. Kolonka využita pro delipidizaci má omezenou kapacitu, a proto zvyšováním naneseného množství materiálu v jednom kroku není možné dosáhnout zlepšení. Možné by bylo opakování celého procesu s jímáním eluátu do jedné zkumavky. Pro zachování statistické relevance by se ale proces

musel opakovat mnohokrát, tím by se výrazně zvýšila časová náročnost a spotřebované množství materiálu. Proto by mohlo být přínosné uvažovat nad automatizací delipidizace. Další možností úpravy metody je provedení celého experimentu „ve skle“. Použitý peptid LW21 je velmi hydrofobní, a proto není možné zcela vyloučit jeho nespecifické zachycení na stěnách plastových mikrozku mávek, špiček a vialek. Použití skleněných zku mávek a skleněných mikropipet v celém průběhu přípravy vzorků by mohlo vést ke snížení ztrát peptidu a tím k možnosti kvantifikace peptidů z vezikul s větší lipidickou maticí.

Kvantifikace z výšky u nesymetrických chromatografických píků (v našem případě „chvostují“) může být nepřesná. Plocha pod křivkou těchto píků by měla lépe dokumentovat množství separované látky. Výpočet inkorporace peptidu u vzorků s počátečním množstvím 5 mol% LW21 byl proto proveden z výšky i plochy získaných chromatografických píků. Výsledky získány z výšky jsou na obr. 21 (str. 41) a z plochy pod křivkou jsou na obr. 22 (str. 41). Množství inkorporovaného peptidu do LUV se při rozdílném zpracování dat liší o 2 % pro vzorky s 25 mol% cholesterolu a u vzorků bez cholesterolu se výsledky vůbec neliší. Proto rozdílné zpracování dat EIC u vzorků obsahujících 10 mol% LW21 nebylo provedeno.

Metoda delipidizace modelových peptidů nebo transmembránových domén proteinů s následnou analýzou pomocí LC/MS je s jistými limitami vhodná pro kvantifikaci inkorporace těchto molekul do liposomů. Tyto limity přípravy vzorků pomocí kapalinové chromatografie jsou však již známé. V budoucnu by tato metoda mohla být využita pro analýzu liposomů, které se využívají pro medicínské účely, např. jako nosiče antigenů při vakcinaci nebo specifickém doručování léčiv do tkání.

7 Závěr

Formování vezikul o určeném složení metodou extruze přes polykarbonátovou membránu proběhlo úspěšně. Z analýzy pomocí DLS byla získána distribuce průměrů takto vytvořených vezikul se středem při 100 nm. Peptid LW21 byl připraven pro LC/MS analýzu jeho delipidizací z vezikul a kvantifikován porovnáním s analýzami kontrolních vzorků připravených smícháním komponent bez přípravy vezikul. Úspěšnost procesu delipidizace byla závislá na množství lipidické matrice ve výchozím materiálu. Při vezikulách s 2,5 mol% LW21 byl proces delipidizace neúspěšný. Při vezikulách s 10 mol% LW21 byl peptid úspěšně zbaven lipidické matrice ve většině analyzovaných vzorků a jeho inkorporaci bylo možné stanovit na 70 %. Také část vzorků s 5 mol% LW21 byla úspěšně delipidizována a kvantifikována, konkrétně ve vzorcích liposomů s cholesterolem byla inkorporace peptidu na úrovni 85 %.

V budoucnu by bylo možné pracovat na úpravě metody pro schopnost kvantifikovat i peptidy s nižším molárním zastoupením nebo automatizaci celého procesu. Metodu je možné za uvedených podmínek použít pro přesnější popis zvoleného modelového systému, konkrétně pro získání informace o množství nelipidové složky ve vezikulách.

8 Zdroje

1. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–31 (1972).
2. Aerts, J. M., Lauwers, A. M. & Heinen, W. Temperature-dependent lipid content and fatty acid composition of three thermophilic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **51**, 155–65 (1985).
3. NCNR - Brian Kirby. The cell membrane. Available at: https://www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/rp/biology/cell_membrane.html. (Accessed: 11th March 2018)
4. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. (W.H. Freeman and Company, 2008).
5. Kates, M., Kushwaha, S. C. & Sprott, G. D. Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. *Methods Enzymol.* **88**, 98–111 (1982).
6. Mao, Y. & Finnemann, S. C. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Small GTPases* **6**, 89–99 (2015).
7. Barber, E. K., Dasgupta, J. D., Schlossman, S. F., Trevillyan, J. M. & Rudd, C. E. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3277–81 (1989).
8. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–32 (1982).
9. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P. & Lanyi, J. K. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **291**, 899–911 (1999).
10. Shinzawa-Itoh, K. *et al.* Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase. *EMBO J.* **26**, 1713–25 (2007).
11. Scott, R. E. Plasma membrane vesiculation: a new technique for isolation of plasma membranes. *Science* **194**, 743–745 (1976).
12. Sanders, C. R., Hare, B. J., Howard, K. P. & Prestegard, J. H. Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **26**, 421–444 (1994).
13. Sanders, C. R. & Prosser, R. S. Bicelles: a model membrane system for all seasons? *Structure* **6**, 1227–1234 (1998).
14. Sanders, C. R. & Landis, G. C. Reconstitution of Membrane Proteins into Lipid-Rich Bilayered Mixed Micelles for NMR Studies. *Biochemistry* **34**, 4030–4040 (1995).
15. Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V. & Sligar, S. G. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* **2**, 853–856 (2002).
16. Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 481–486 (2016).
17. Milic, D. & Veprintsev, D. B. Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies. *Front. Pharmacol.* **6**, 1–24 (2015).

18. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 102 (2013).
19. Green, M. R. (Michael R., Sambrook, J. & Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012).
20. Kaiser, H.-J. *et al.* Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16628–33 (2011).
21. Ramadurai, S. *et al.* Lateral Diffusion of Membrane Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 12650–12656 (2009).
22. Ottova-Leitmannova, A. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes. Volume 4*. (Elsevier/Academic Press, 2006).
23. Reeves, J. P. & Dowben, R. M. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.* **73**, 49–60 (1969).
24. Dimitrov, D. S. & Angelova, M. I. Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields. in *New Trends in Colloid Science* **73**, 48–56 (Steinkopff, 1987).
25. Iwahashi, Y. & Nakamura, T. Orientation and reactivity of NADH kinase in proteoliposomes. *J. Biochem.* **105**, 922–6 (1989).
26. Doyle, D. A. *et al.* The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77 (1998).
27. de Planque, M. R. R. & Killian, J. A. Protein–lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring (Review). *Mol. Membr. Biol.* **20**, 271–284 (2003).
28. Killian, J. A. Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. in *FEBS Letters* **555**, 134–138 (2003).
29. Killian, J. A. *et al.* Induction of Nonbilayer Structures in Diacylphosphatidylcholine Model Membranes by Transmembrane α -Helical Peptides: Importance of Hydrophobic Mismatch and Proposed Role of Tryptophans. *Biochemistry* **35**, 1037–1045 (1996).
30. de Planque, M. R. *et al.* Sensitivity of single membrane-spanning alpha-helical peptides to hydrophobic mismatch with a lipid bilayer: effects on backbone structure, orientation, and extent of membrane incorporation. *Biochemistry* **40**, 5000–5010 (2001).
31. Harzer, U. & Bechinger, B. Alignment of Lysine-Anchored Membrane Peptides under Conditions of Hydrophobic Mismatch: A CD, 15N and 31P Solid-State NMR Spectroscopy Investigation. *Biochemistry* **39**, 13106–13114 (2000).
32. De Planque, M. R. R. *et al.* Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions. *Biochemistry* **42**, 5341–5348 (2003).
33. White, S. H. & Wimley, W. C. Membrane protein folding and stability: Physical Principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 319–365 (1999).

34. Mouritsen, O. G. & Bloom, M. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys. J.* **46**, 141–53 (1984).
35. De Planque, M. R. R. *et al.* Influence of lipid/peptide hydrophobic mismatch on the thickness of diacylphosphatidylcholine bilayers. A2H NMR and ESR study using designed transmembrane α -helical peptides and gramicidin A. *Biochemistry* **37**, 9333–9345 (1998).
36. Mall, S., Broadbridge, R., Sharma, R. P., East, J. M. & Lee, A. G. Self-association of model transmembrane α -helices is modulated by lipid structure. *Biochemistry* **40**, 12379–12386 (2001).
37. Strandberg, E. *et al.* Lipid dependence of membrane anchoring properties and snorkeling behavior of aromatic and charged residues in transmembrane peptides. *Biochemistry* **41**, 7190–7198 (2002).
38. Parmar, M. M., Edwards, K. & Madden, T. D. Incorporation of bacterial membrane proteins into liposomes: factors influencing protein reconstitution. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1421**, 77–90 (1999).
39. Berne, B. J. & Pecora, R. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics.* (Dover Publications, 2000).
40. Fonseca, P. & Light, A. Incorporation of bovine enterokinase in reconstituted soybean phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **258**, 3069–74 (1983).
41. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* **109**, 129–35 (1972).
42. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **39**, 1157–75 (1960).
43. Vit, O. *et al.* Large-scale identification of membrane proteins based on analysis of trypsin-protected transmembrane segments. *J. Proteomics* **149**, 15–22 (2016).
44. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
45. Adamson, J. T. & Hakansson, K. Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Lectin Analysis. in *Lectins* 343–371 (Elsevier, 2007). doi:10.1016/B978-044453077-6/50015-6
46. mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool. Available at: <http://www.mmass.org/>. (Accessed: 29th March 2018)
47. Arriaga, L. R. *et al.* Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* **96**, 3629–3637 (2009).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka